

Molekulare Charakterisierung von
Typ IV Sekretionssystem-spezifischen Wirtszellantworten
und bakteriellen Virulenzfaktoren des humanen
Magenpathogens *Helicobacter pylori*

Dissertation

zur Erlangung des Akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Bianca Bauer

*26.03.1975 in München

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christopf Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:

- 1) Prof. Erwin Schneider
- 2) Prof. Thomas F. Meyer
- 3) Prof. Thomas Sommer

Tag der mündlichen Prüfung:

16. April 2009

Teile dieser Arbeit wurden oder werden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Bauer, B., Stefan, M., Bartfeld, S., Meyer, S., und Selbach, M. (2005) Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretions system of *Helicobacter pylori*. Infect. Immun., 73(8):4643-52

Bauer, B., Bartfeld, S. und Meyer, TF. (2008) *H. pylori* selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA. Cell. Microbiol. (22 Okt 2008; elektronische Druckausgabe (Epub) einsehbar)

Bauer, B., Bartfeld, S., Holland, C., Maeurer, A. und Meyer, TF. (2008) Prolonged infections with *Helicobacter pylori* impair epithelial wound healing by interfering with EGFR signaling. (in Vorbereitung)

Bauer, B., Asakura, H., Machuy, N., Bartfeld, S. und Meyer, TF. (2008) A genome-wide screen for NF- κ B effectors, T4SS components and bacterial adhesins of *Helicobacter pylori*. (in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	16
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> , das humane Magenpathogen	16
1.2. Pathogenese	17
1.3. Die Immunantwort	18
1.4. Bakterielle Virulenzfaktoren	20
1.4.1. Urease, Flagellen und Adhäsine	20
1.4.2. Der sekretierte Autotransporter VacA	20
1.4.3. Die <i>cag</i> Pathogenitätsinsel	21
1.4.4. CagA, das translozierte Effektorprotein	23
1.4.5. CagA und der EGF-Rezeptor	24
2. Zielsetzungen.....	26
2.1. Analyse zellinienspezifischer, Typ IV Sekretionssystem abhängiger Wirtszellantworten	26
2.2. Funktionale Analyse des Effektors CagA - Wie CagA den EGF-Rezeptor kontrolliert und manipuliert	26
2.3. Identifikation von bakteriellen NF- κ B Effektoren, Typ IV Sekretionssystem-Komponenten und Adhäsinen von <i>H. pylori</i> durch einen genomweiten bakteriellen <i>Screen</i>	27
3. Analyse zellinienspezifischer, Typ IV Sekretionssystem abhängiger Wirtszellantworten	28
3.1. Die T4SS vermittelte Translokation von CagA	29
3.2. Die Prozessierung von CagA in <i>H. pylori</i> infizierten Zellen	31
3.3. Die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen	32
3.4. Morphologische Veränderungen von <i>H. pylori</i> infizierten Zellen	33
3.5. Die Sekretion von Chemokinen	34
3.6. Diskussion Ergebnisteil 1	38
3.6.1. Die Translokation des Effektors CagA	38
3.6.2. Die Prozessierung von CagA	39
3.6.3. Die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen	40
3.6.4. T4SS induzierte morphologische Veränderungen-eher die Ausnahme als die Regel ..	41
3.6.5. Das T4SS und die proinflammatorische Reaktion des Wirts	42
3.6.6. Schlusswort	44

4. <i>H. pylori</i> manipuliert selektiv die Endozytose und die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch eine CagA abhängige Aktivierung von c-Abl und SHP-2.....	45
4.1. <i>H. pylori</i> blockiert die Endozytose des EGF-Rezeptors durch die CagA abhängige Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl	48
4.1.1. Der <i>H. pylori</i> Effektor CagA erhöht die EGF-Rezeptor Oberflächenexposition auf gastrischen Epithelzellen nach verlängerter Infektionsdauer	48
4.1.2. Die <i>H. pylori</i> induzierte Erhöhung der Rezeptor-Population auf der Wirtszelloberfläche richtet sich selektiv gegen den EGF-Rezeptor	53
4.1.3. Die erhöhte EGF-Rezeptor Oberflächenexposition auf <i>H. pylori</i> infizierten Zellen basiert auf einer Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose.....	54
4.1.4. <i>H. pylori</i> inhibiert auch die Liganden-abhängige EGF-Rezeptor Degradierung.....	56
4.1.5. Die Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose wird durch die eukaryotische Nicht-Rezeptor Kinase c-Abl eingeleitet	57
4.1.6. c-Abl inhibiert die EGF-Rezeptor Endozytose durch eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173.....	60
4.2. Diskussion Ergebnisteil 2- <i>H. pylori</i> inhibiert die Endozytose des EGF-Rezeptors.....	63
4.2.1. <i>H. pylori</i> blockiert gezielt die EGF-Rezeptor Endozytose und erhöht so die Oberflächenexposition der Rezeptor-Tyrosinkinase	63
4.2.2. Der Effektor CagA - das multifaktorielle Adapterprotein von <i>H. pylori</i>	64
4.2.3. Die Zusammenhänge zwischen Rezeptor-Endozytose und Ubiquitylierung.....	64
4.2.4. Schlusswort und Modell	65
4.3. <i>H. pylori</i> hemmt die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch eine CagA abhängige Aktivierung der Phosphatase SHP-2	67
4.3.1. <i>H. pylori</i> inhibiert den EGF abhängigen Wundheilungsprozess von infizierten gastrischen Epithelzellen	67
4.3.2. CagA inhibiert die EGF und HB-EGF vermittelte EGFR-Transaktivierung nach verlängerter Infektionsdauer.....	69
4.3.3. Die inhibierte Rezeptor-Transaktivierung richtet sich gezielt gegen den EGF-Rezeptor	71
4.3.4. Die inhibierte EGF-Rezeptor Transaktivierung hemmt die EGF abhängige Formation und Aktivierung des SHC/Grb2/EGFR-Komplexes	72
4.3.5. In <i>H. pylori</i> infizierten Zellen wird ERK1/2 Signalkaskade trotz der inhibierten EGFR/SHC/Grb2-Komplexbildung aktiviert	74
4.3.6. Der EGF-Rezeptor ist weder an der EGF abhängigen noch an der EGF unabhängigen Aktivierung von ERK1/2 in infizierten Zellen beteiligt	77

4.3.7. Neben der ERK1/2 Kaskade werden auch andere EGF-Rezeptor Signalwege selektiv durch <i>H. pylori</i> manipuliert	78
4.3.8. Die Phosphatase SHP-2 vermittelt sowohl die Inaktivierung des EGF-Rezeptors als auch die EGF unabhängige Basalaktivierung von ERK1/2	81
4.4. Diskussion Ergebnisteil 3 - <i>H. pylori</i> inhibiert die EGF-Rezeptor Transaktivierung und EGF abhängige Wundheilung.....	83
4.4.1. Kurzzeitinfektion versus Langzeitinfektion - Auswirkungen auf die zelluläre Signaltransduktion	83
4.4.2. Die EGF-Rezeptor Inhibierung und ihre Konsequenzen für die Bildung von Magengeschwüren	84
4.4.2.1. Hemmung des Wundheilungsprozesses	84
4.4.2.2. Erhöhte Säuresekretion	85
4.4.3. Die ERK1/2 Aktivierung in <i>H. pylori</i> infizierten Zellen liefert konkrete Hinweise auf komplexe Kontrollmechanismen der zellulären Signaltransduktion	85
4.4.4. Die Analyse von weiteren EGF-Rezeptor Signalmolekülen liefert ein sehr differenziertes Aktivierungsmuster.....	87
4.4.5. Der c-Met Rezeptor – Ein Schlüsselfaktor in der <i>H. pylori</i> assoziierten Krebsentstehung?	87
4.4.6. Warum blockiert <i>H. pylori</i> die EGF-Rezeptor Transaktivierung?	88
4.4.7. Die CagA abhängige Aktivierung von SHP-2 inhibiert den EGF-Rezeptor	89
4.4.8. Schlusswort.....	89
5. Identifikation von bakteriellen NF-κB Effektoren, Typ IV Sekretionssystem-Komponenten und Adhäsinen von <i>H. pylori</i> durch einen genomweiten bakteriellen Screen...	91
5.1. Der erste manuelle Etablierungsschritt für den <i>Screen</i> : Auf der Suche nach der geeigneten MOI und Infektionszeit	95
5.2. Das Zufallsexperiment: Analyse von zehn zufällig ausgewählten Einzelklonen der Mutanten-Bibliothek	98
5.3. Der Test- <i>Screen</i> unter Nutzung der automatisierten Roboter-Plattform	99
5.4. Der <i>Screen</i>	102
5.5. Diskussion Ergebnisteil 4.....	105
5.5.1. Der klassische genetische <i>Screen</i>	105
5.5.2. Ziele und Möglichkeiten des <i>H. pylori</i> Screens	105
5.5.3. Gedanken zum <i>Read-Out</i> System.....	106
5.5.4. Schlusswort.....	108
6. Material und Methoden	109

6.1.	Allgemeine DNA-Arbeitstechniken	109
6.1.1.	Präparation von Plasmid-DNA	109
6.1.2.	Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	109
6.2.	Material und allgemeine Methoden für eukaryotische Zellen	110
6.2.1.	Zelllinien.....	110
6.2.2.	Kultivierung.....	111
6.2.3.	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	112
6.2.4.	Auftauen und Rekultivierung von eukaryotischen Zellen	112
6.2.5.	EGF und HGF Stimulation.....	112
6.2.6.	Inhibitor-Behandlung.....	112
6.2.7.	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA.....	112
6.2.8.	Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNAs.....	113
6.2.9.	Herstellung stabiler „knock-out“ Zelllinien	114
6.2.10.	FACS-Analyse	115
6.2.10.1.	Analyse der Rezeptor-Oberflächenexpression auf eukaryotischen Zellen	116
6.2.10.2.	Analyse der Aufnahme von Alexa488-markiertem EGF	117
6.2.11.	<i>In vitro</i> Kinase-Assay	117
6.2.12.	ELISA	118
6.2.13.	Immunofluoreszenzfärbung.....	118
6.2.14.	Wundheilungs-Experimente	119
6.3.	Material und Methoden zum Umgang mit <i>H. pylori</i>	120
6.3.1.	<i>Helicobacter</i> Stämme.....	120
6.3.2.	Kultivierung.....	120
6.3.3.	Infektion eukaryotischer Zellen	122
6.4.	Allgemeine Proteintechniken	122
6.4.1.	Immunodetektion von Proteinen.....	122
6.4.1.1.	SDS-PAGE	122
6.4.1.2.	Immunoblot.....	123
6.5.	Immunopräzipitation	124
6.6.	RNA-Techniken	126
6.6.1.	<i>Real-Time</i> PCR.....	126
6.7.	Material und Methoden zum bakteriellen <i>Screen</i>	128
6.7.1.	Das <i>Read-out</i> System.....	128
6.7.2.	Die bakterielle Transposon-basierte Mutanten-Bibliothek von <i>H. pylori</i>	130
6.7.3.	Identifikation der Transposon-Insertionsorte.....	130

6.7.4. Vereinzelung und Vorbereitung der Mutanten für den Screen	131
6.7.5. Etablierung der automatisierten <i>Screening</i> -Plattform.....	132
6.7.6. Der Roboter und die Roboter-Software.....	133
6.7.7. Der Z-Score für die Definition von <i>Hits</i>	134
6.7.8. Der Z` Faktor zur Ermittlung der Qualität eines <i>Screens</i>	134
6.8. Sonstiges	135
6.9. Verwendete Computer Programme.....	135
7. Literaturverzeichnis	136
8. Publikationsliste	147
9. Kongressbeiträge	148
10. Danksagung.....	149



Abkürzung	Beschreibung
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AKT	Proteinkinase B
AlpA/B	engl: <i>adherence-associated lipoprotein A/B</i>
Ap-1	engl: <i>activator protein 1</i>
BabA	engl: <i>Leb blood group antigen binding adhesion A</i>
BHI	engl: <i>brain heart infusion</i>
BLAST	engl: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	engl: <i>bovine serum albumin</i>
c-Abl	engl: <i>Cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Cag	engl: <i>cytotoxin-associated gene</i>
CagA	engl: <i>cytotoxin-associated gene A</i>
Cam ^R	Chloramphenicol Resistenz
Cbl	engl: <i>C asitas B-lineage L ymphoma</i>
<i>C. griseus</i>	<i>Cricetulus griseus</i>
<i>C. lupus</i>	<i>Canis lupus</i>
<i>C. sabaeus</i>	<i>Chlorocebus sabaeus</i>
c-Kit	engl: <i>v-kit Hardy-Zuckermann 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
c-Met	engl: <i>mesenchymal-epithelial transition factor</i>
Crk	engl: <i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog</i>
DMEM	engl: <i>Dulbeccos's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethyldulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEA1	engl: <i>early endosomal antigen 1</i>
EGF	engl: <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	engl: <i>epidermal growth factor receptor</i>
Egr1	engl: <i>early growth response gene 1</i>
ELISA	engl: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ErbB	engl: <i>erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog</i>
ERK1/2	engl: <i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FACS	engl: <i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	engl: <i>focal adhesion kinase</i>
FCS	engl: <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fos	engl: <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
FSC	engl: <i>Forward Scatter</i>
GAG	Gruppenspezifisches Antigen
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GFP	engl: <i>green fluorescent protein</i>
Grb2	engl: <i>growth factor receptor-bound protein2</i>
Gro- α	engl: <i>Growth-regulated oncogene-alpha</i>
h	Stunde/n
<i>H. hepaticus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HB-EGF	engl: <i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>

Abkürzung	Beschreibung
HGF	engl: <i>hepatocyte growth factor</i>
HLA-E	engl: <i>major histocompatibility complex (MHC) class-I molecule</i>
HopZ	engl: <i>H. pylori outer membrane protein Z</i>
HorB	engl: <i>H. pylori outer membrane protein B</i>
Hrp	engl: <i>horseradish peroxidase</i>
HSP60	engl: <i>heat shock protein 60</i>
ICAM-1	engl: <i>intracellular adhesion molecule</i>
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-8	Interleukin 8
Jak	Janus Kinase
Kan ^R	Kanamycin Resistenz
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LFA-1	engl: <i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	engl: <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MEK1/2	engl: <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>
MARK	engl: <i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase</i>
MHC	engl: <i>major histocompatibility complex</i>
Mip-2	engl: <i>major intrinsic protein superfamily</i>
MOI	engl: <i>multiplicity of infection</i>
<i>M. Musculus</i>	<i>Mus Musculus</i>
NF- κ B	engl: <i>nuclear factor κB</i>
NO	engl: <i>nitric oxide</i>
Nod1	engl: <i>nucleotide-binding oligomerization domain containing 1</i>
Nr	Nummer
OMP	engl: <i>outer membrane protein</i>
ORF	engl: <i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
Pak2	engl: <i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2</i>
PAR1	engl: <i>protease activated receptor 1</i>
PBS	engl: <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PDGF	engl: <i>Platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat: pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphotidylinositol 3 Kinase
PR	Phosphoresistent
PKC	Protein Kinase C
PLC γ	Phospholipase C gamma
POL	Polymerase
pY	Phospho-Tyrosin
RISC	engl: <i>RNAi induced silencing complex</i>
RNA	engl: <i>Ribonucleinacid</i>
RNAi	engl: <i>RNA interference</i>
ROS	engl: <i>reactive oxygen species</i>

Abkürzung	Beschreibung
rpm	engl: <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
SabA/B	engl: <i>sialic acid-binding adhesin A/B</i>
SDS	engl: <i>sodium dodecyl sulfat</i>
SH2	engl: <i>Src homology 2 domain</i>
SHC	engl: <i>Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
SHP-2	engl: <i>SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
shRNA	engl: <i>small hairpin RNA</i>
siRNA	engl: <i>small interfering RNA</i>
Src	engl: <i>sarcoma</i>
SSC	engl: <i>Side Scatter</i>
STAT	engl: <i>Signal Transducers and Activators of Transcription protein</i>
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T _H 1-Zellen	Typ1 T-Helferzellen
T _H 2 Zellen	Typ2 T-Helferzellen
TJ	engl: <i>tight junctions</i>
TLR	engl: <i>toll-like receptor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
ü.N.	über Nacht
VacA	engl: <i>vacuolating toxin A</i>
VSV-G	engl: <i>Vesikular Stomatitis Viral Glycoprotein</i>
w/v	Masse pro Volumen
WHO	engl: <i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
ZO-1	engl: <i>zonula occludens 1</i>



Das humane Magenpathogen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) besiedelt den menschlichen Magen schon seit Jahrtausenden und langjährige Infektionen können zu der Entstehung schwerwiegender Krankheiten wie Magenkrebs und Magengeschwüren führen. Die *H. pylori* induzierte Pathogenese ist eng mit der Expression eines bakteriellen Typ IV Sekretionssystems (T4SS) assoziiert, das die Translokation des Effektorproteins CagA in die Wirtszelle vermittelt.

Bisher ist noch unbekannt, in welchem Ausmaß wirtszellspezifische Faktoren die T4SS induzierte Pathogenese auf molekularer Ebene beeinflussen. Deshalb sollte dieser Aspekt hier systematisch analysiert werden. Hierfür wurden 19 eukaryotische Zelllinien, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft in der Expression verschiedener Wirtszellfaktoren unterscheiden, mit *H. pylori* infiziert und auf die Ausprägung T4SS induzierter Phänotypen untersucht. Interessanterweise unterschieden sich die infizierten Zelllinien tatsächlich erheblich in ihrer zellulären Antwort auf das T4SS, was hervorhebt, was für eine große Rolle Wirtszellfaktoren in der *H. pylori* induzierten Pathogenese spielen. Diese Ergebnisse liefern bedeutungsvolle Hinweise für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die die Wichtigkeit von Wirtszelldeterminanten miteinbeziehen.

Auch der genaue Aufbau des bakteriellen T4SSs ist noch nicht vollständig geklärt und bisher konnten neben CagA und Peptidoglycan keine weiteren translozierten Effektoren identifiziert werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine genomweite Screening-Methode etabliert, die es ermöglicht, sowohl neue Komponenten des T4SSs als auch translozierte NF- κ B Effektoren und bakterielle Adhäsine zu identifizieren. Die Ergebnisse sollen das Verständnis der T4SS induzierten Pathogenese erweitern und dabei helfen neue bakterielle, medizinisch relevante Angriffspunkte zu identifizieren.

Der translozierte Effektor CagA ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori*. Dennoch ist die genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt. Um die Rolle von CagA in der *H. pylori* induzierten Pathogenese besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von CagA auf den EGF-Rezeptor untersucht, ein Rezeptor, der durch das Steuern zellproliferatorischer Vorgänge ebenfalls eng mit der Entstehung von Krebs in Verbindung steht und in den ersten Stunden einer *H. pylori* Infektion aktiviert wird. Hierbei stellte sich heraus, dass CagA nach längeren Infektionsperioden die Endozytose des EGF-Rezeptors durch die Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl hemmt und dadurch eine starke Erhöhung der Rezeptorpopulation auf der Wirtszelloberfläche induziert. Interessanterweise führt dieser Effekt jedoch nicht zu einer Verstärkung der EGF-Rezeptor Signaltransduktion. Vielmehr kommt es zu einer Hemmung der EGF-Rezeptor Transaktivierung und zu einer Blockade der EGF vermittelten Wundheilung. Die Daten sprechen demnach gegen die gängige Hypothese, dass die EGF-Rezeptor Transaktivierung Magenkrebs induziert und weisen vielmehr auf eine Rolle des EGF-Rezeptors in der *H. pylori* induzierten Geschwürbildung hin. Interessanterweise bleiben einige Komponenten des EGF-Rezeptor Signalwegs dennoch intakt und demonstrieren so, wie selektiv *H. pylori* wirtszellspezifische Signaltransduktionswege kontrolliert und manipuliert. Auch der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus konnte hier entschlüsselt werden, der sowohl von CagA als auch von der Phosphatase SHP-2 gesteuert wird.

Zusammengefasst liefert die Arbeit nicht nur mechanistische Einblicke in die molekularen Vorgänge T4SS vermittelter Wirtszellantworten und in die Funktion von CagA, sondern ermöglicht durch den hier entwickelten Screen zusätzlich die Identifikation unbekannter bakterieller Virulenzfaktoren, die direkt in die T4SS induzierte Pathogenese involviert sind.

The highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) colonizes at least half of the world's population and elicits a tremendous medical burden because of its causative association with peptic ulcer disease and gastric cancer. The pathogenic potential of *H. pylori* is intricately linked to the expression of a pathogenicity island encoded type IV secretion system (T4SS), which translocates the bacterial effector protein CagA into the eukaryotic host cell. Despite substantial scientific work, the role of host cell determinants in T4SS mediated pathogenesis has not yet been systematically examined. Furthermore, neither the exact assembly of the T4SS apparatus nor additionally translocated effector molecules, except CagA and Peptidoglycan, are known so far.

To elucidate the role of host cell factors within T4SS induced host cell responses, 19 different eukaryotic cell lines were analyzed systematically for respective phenotypes. Since the examined cell lines differ in their genetic background and therefore in the expression of specific host cell factors, they are a powerful tool for the determination of host cell factor significance in pathogenic mechanisms.

Remarkably, T4SS mediated host responses among these cell lines varied considerably, thereby demonstrating the importance of host cell components in *H. pylori* induced pathogenesis. These results have implications for the development of novel therapeutic strategies, strongly suggesting host environmental conditions should be taken into consideration. In addition, a *H. pylori* genome wide bacterial screen for factors important in pathogenesis, such as unknown T4SS components or novel Nf- κ B effector molecules, was developed and optimized.

The prominent effector CagA is strongly linked to the development of severe disease, including cancer; however, the precise function of this protein remains unclear. To functionally characterize the role of CagA, its impact on the epidermal growth factor (EGF)-receptor pathway was analyzed. The results suggest a mechanism where EGF-receptor endocytosis is completely blocked during prolonged infections, leading to an elevated receptor surface exposition. This blockage is mediated by the CagA induced activation of c-Abl, a non-receptor kinase phosphorylating the EGF-receptor tyrosine 1173, followed by inhibition of EGF-receptor internalization and degradation.

Surprisingly, EGF-receptor transactivation and EGF-dependent wound healing are selectively blocked during prolonged infections, indicating that an increased receptor-population on the cell surface does not necessarily promote signaling. This data contradicts the current hypothesis that transactivated EGF-receptor signaling is involved in the development of *H. pylori* mediated gastric cancer and instead suggests a role for the EGF-receptor in *H. pylori*-induced ulcer disease. The underlying molecular mechanism was identified as being SHP-2 and CagA dependent.

Intriguingly, several components of the EGF-receptor pathway remain functional during infections with *H. pylori*, stressing the complexity of host-pathogen interactions.

Taken together, this work reveals profound mechanistic insights into the function and selectivity of the T4SS and its translocated effector CagA. Furthermore, the newly established screening procedure has laid the foundations for future insight and discovery of as yet unknown bacterial virulence factors critical to *H. pylori* pathogenesis.

1. Einleitung

1.1. *Helicobacter pylori*, das humane Magenpathogen

Die ersten Bakterien im menschlichen Magen wurden bereits 1893 entdeckt (Bizzozero *et al.*, 1893). Da ein Überleben von Bakterien im sauren Milieu des Magens jedoch für unmöglich gehalten wurde, erklärte man sich die Beobachtung mit der Aufnahme von kontaminierter Nahrung. Erst 90 Jahre später gelang Barry Marshall und Robin Warren die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung eines den menschlichen Magen kolonisierenden, spiralförmigen, mikroaerophilen Bakteriums (**Abb. 1.1**), welches den Menschen bereits seit zehntausend Jahren besiedelt: *Helicobacter pylori* (Falush *et al.*, 2003; Marshall und Warren, 1984). Die lange Verbindung zwischen dem Bakterium und dem Menschen ermöglicht es, menschliche Migrationen durch eine Genotypisierung verschiedener Stämme aus unterschiedlichen Regionen der Erde zu analysieren. So konnte schließlich ein umfassendes Bild jahrtausendlanger Wanderungsprozesse des Menschen generiert werden (Falush *et al.*, 2003).

Nach der Identifikation und Isolierung des Bakteriums stellte sich heraus, dass es sich bei dem Bakterium nicht um einen harmlosen Kommensalen handelt, sondern um einen pathogenen Organismus, der die Entstehung schwerer Erkrankungen wie Magenkrebs und Magengeschwüren begünstigt (Marshall *et al.*, 1985; Morris und Nicholson, 1987). Da Morris und Marshall durch einen Selbstversuch mit *H. pylori* das erste Bakterium nachweisen konnten, das Entzündungen des Gewebes hervorrufen kann, erhielten sie 2006 den Nobelpreis für Medizin. Die Ergebnisse weiterer Studien zeigten, dass eine Infektion mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) zu einer Vielzahl gastrointestinaler Erkrankungen wie chronischer Gastritis, Magengeschwüren, MALT-Lymphomen (MALT: *mucosa-associated lymphoid tissue*)¹ und Magenkrebs führen kann.

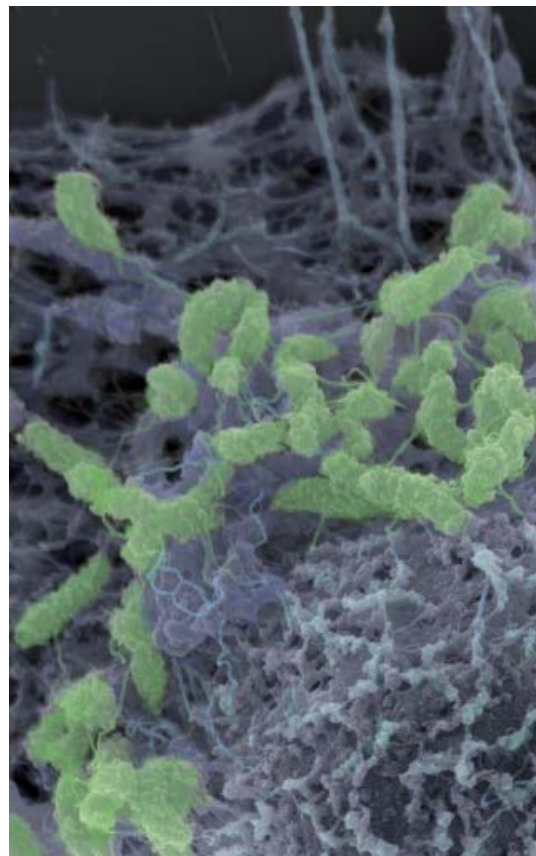


Abb. 1.1: Das spiralförmige gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori*.

Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori* infizierten AGS-Zellen nach einer Zytoskelett-Präparation. Bakterien (grün) adhären auf dem Zytoskelett der Wirtszelle.

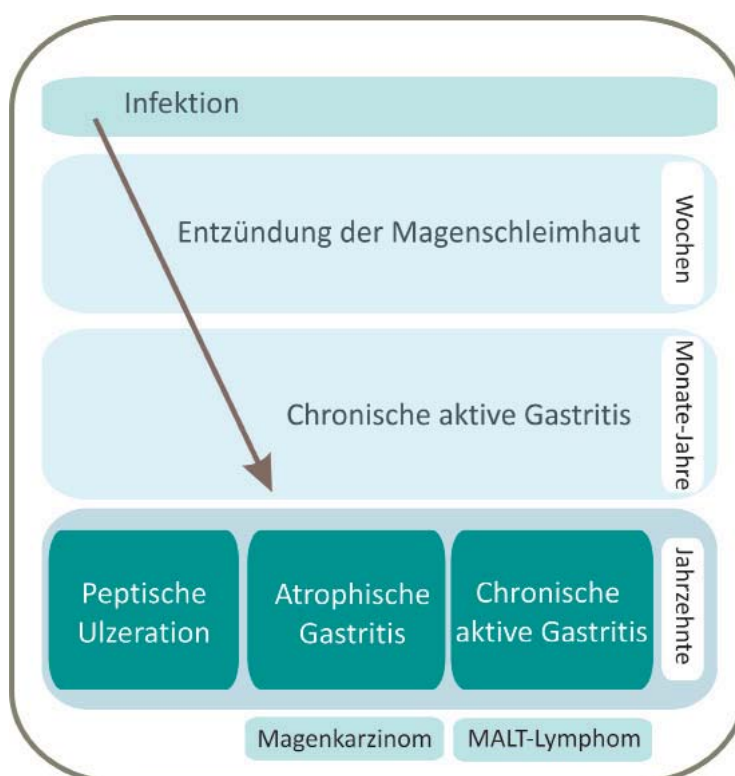
¹ Da es schwierig sein kann, englische Begriffe ins Deutsche zu übersetzen, wurden in dieser Arbeit teilweise englische Termini verwendet und durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet.

Dies führte schließlich dazu, dass das Pathogen 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als ein Klasse 1 Karzinogen eingestuft wurde (WHO, 1994). Obwohl diese Klassifizierung umfangreiche Forschungsarbeiten nach sich zog, ist die Frage, warum und wie *H. pylori* pathogene Prozesse induziert, noch nicht vollständig geklärt. Bisher geht man davon aus, dass für die Entstehung schwerwiegender Krankheiten viele Faktoren aufeinander treffen müssen. Hierzu gehören beispielsweise unterschiedliche Lebensumstände (Rauchen, Nahrung), bakterielle Stämme und genetische Veranlagungen infizierter Patienten (Epplein *et al.*, 2008; Koivisto *et al.*, 2008; Namiot *et al.*, 2007).

Heute sind schätzungsweise 50% der Weltbevölkerung mit dem Magenkeim infiziert und in Anbetracht der Tatsache, dass trotz moderner Behandlungsmöglichkeiten jährlich immer noch ca. 405 000 Menschen an Magenkrebs sterben, ist die Erforschung der molekularen Wirt-Pathogen Interaktion von großer medizinischer Bedeutung.

1.2. Pathogenese

Eine langjährige Infektion mit *H. pylori* ruft immer eine histologisch nachweisbare Gastritis hervor, die in Abhängigkeit ihres Entstehungsorts entweder zu einem Anstieg oder Ab-



fall der gastrischen Säuresekretion führen kann (Abb. 1.2). Hierbei kann es zu einer Nicht-atrophischen antralen Gastritis oder einer atrophischen Gastritis kommen. Eine Nicht-atrophische antrale Gastritis resultiert in einer erhöhten Säureproduktion, die zu der Entstehung von duodenalen Geschwüren führt (Konturek *et al.*, 1990; Shaw *et al.*, 1987).

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Pathogenese einer *H. pylori* Infektion.

Eine Infektion mit *H. pylori* kann nach jahrelanger Infektion zu der Entstehung ernsthafter Krankheiten führen. Angefangen mit einer Entzündung der Mukosa (Magenschleimhaut) entwickelt sich eine chronische, aktive Gastritis, die je nach Entstehungsort und Intensität zu ei-

ner atrophischen Gastritis oder peptischer Ulzeration heranwachsen kann. Die atrophische Gastritis kann sich zu einem Magenkarzinom entwickeln, aus der chronischen aktiven Gastritis kann ein MALT-Lymphom entstehen (Kusters *et al.*, 2006; Telford *et al.*, 1997).

Dieser Vorgang wird als peptische Ulzeration bezeichnet. Im Gegensatz dazu resultiert eine atrophische Gastritis des Magenkorpus und Magenantrums (Abb. 1.3) in einer verringerten

Säuresekretion und begünstigt so die Entwicklung von Magenkarzinomen (Peek, Jr. und Blaser, 2002).

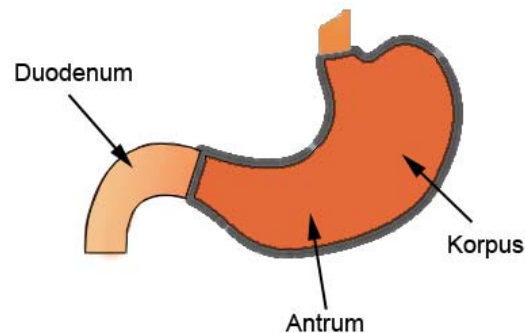


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des menschlichen Magens.

Der menschliche Magen wird in fünf Bereiche eingeteilt: Kardie (Mageneingang), Fundus (Magengrund), Korpus (Magenkörper), Antrum und Pylorus (Magenpförtner). Der Pylorus bildet den Übergang zum Duodenum (Zwölffingerdarm).

Interessanterweise häufen sich in letzter Zeit ebenfalls Studien über positive Auswirkungen von *H. pylori* Infektionen auf den gesundheitlichen Zustand des Patienten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Infektion in frühester Kindheit das Risiko zu einer Entwicklung von Allergien und Asthma reduziert (Blaser *et al.*, 2008; Chen und Blaser, 2007). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass es in mit *H. pylori* infiziertem Gewebe zu einer starken Einwanderung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) kommt, die Immunantworten gezielt unterdrücken (Enarsson *et al.*, 2006; Lundgren *et al.*, 2005). Trotz der unangezweifelten Assoziation von pathogenen *H. pylori* Stämmen und der Entwicklung von Magenkrebs und Magengeschwüren verdeutlichen kontroverse Diskussionen dieser Art, wie unklar die Einflüsse von *H. pylori* auf den Menschen sind und unterstreichen die Wichtigkeit weiterführender Studien (Bourzac und Guillemin, 2005; Hatakeyama und Brzozowski, 2006).

1.3. Die Immunantwort

H. pylori Infektionen zeichnen sich durch die Induktion einer sehr komplexen Immunantwort aus. So hat das Pathogen verschiedenste Mechanismen entwickelt, um der Immunreaktion des Wirts zu entgehen. Ein bedeutender Mechanismus wird hierbei durch den Virulenzfaktor VacA (*vacuolating cytotoxin A*; siehe S. 20-21) vermittelt (Abb. 1.4), für den gezeigt werden konnte, dass er die Reifung von T-Lymphozyten und B-Zellen blockieren kann (Gebert *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2007). Durch die gezielte Unterdrückung einer erfolgreichen Immunreaktion verhindert VacA, dass die einwandernden Immunzellen zu einer erfolgreichen Eradizierung des Pathogens führen. Aber auch zahlreiche weitere Mechanismen helfen dem Pathogen der Immunantwort zu entfliehen.

So ist *H. pylori* beispielsweise in der Lage, durch die gezielte Hemmung der Synthese von Stickoxiden (NO) die Produktion von Makrophagen aktivierenden Molekülen zu inhibieren (Gobert *et al.*, 2001, 2002). Darüber hinaus kann *H. pylori* der Phagozytose durch Makrophagen entgegen wirken, indem das Bakterium Cholesterol glykosyliert und in seine Zellmembran einbaut (Wunder *et al.*, 2006). Andere Studien haben gezeigt, dass die von Makrophagen gebildeten Phagosomen nach Aufnahme der Bakterien fusionieren und zu Megasomen anwachsen, in denen die Bakterien nicht getötet werden können. Die Megasomen können so von den Bakterien gezielt als Nische genutzt werden. Für diesen Vorgang werden viele bakterielle Virulenzfaktoren wie VacA, Urease und das Typ IV Sekretionssystem von *H. pylori* (siehe S. 21-21) benötigt (Allen *et al.*, 2000; Schwartz und Allen, 2006). In der langjährigen Persistenz des Bakteriums spielt außerdem die schon auf Seite 12 erwähnte *H. pylori* induzierte Erhöhung von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) im Magen und Duodenum eine große Rolle. Sie führt zu einer aktiven Unterdrückung T-Zell vermittelter Prozesse, durch die *H. pylori* der Immunantwort ausweichen kann (Lundgren *et al.*, 2005).

Obwohl *H. pylori* einen Teil der Immunantwort supprimiert, kommt es in infiziertem Gewebe dennoch stets zu einer proinflammatorischen Reaktion. Diese wird von adhärenenten Bakterien induziert und zeichnet sich durch eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukin 8 (IL-8) aus. Die Zytokine rekrutieren und aktivieren Neutrophile und Monozyten in der Magenmukosa (Magenschleimhaut), welche reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen bilden (Abb. 1.4), die zu Schädigungen des Magenepithels führen können (Dallegrì und Ottoneo, 1997).

Die individuelle Immunantwort des Wirts bestimmt den Krankheitsverlauf entscheidend mit. Dieser ist eng mit dem Verhältnis von sekretierten pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen assoziiert. Bei Infektionen, die einen schwerwiegenden Krankheitsverlauf induzieren, findet man, im Gegensatz zu Infektionen die unbemerkt bleiben, häufig eine Verschiebung des Zytokin-Gleichgewichts (Abb. 1.4). Hier begünstigt beispielsweise eine erhöhte Ausschüttung von IL-12 die Entwicklung von T_H1 -Zellen (Typ1 T-Helferzellen), die an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind (D'Elis *et al.*, 1997). Eine Verlagerung des Gleichgewichts zugunsten von T_H1 -Zellen endet häufig in der Zerstörung des mukosalen Gewebes sowie in der Zerstörung der ökologischen Nische von *H. pylori* durch Atrophie (Karnes, Jr. *et al.*, 1991). Demzufolge ist eine starke proinflammatorische Reaktion weder vorteilhaft für den Wirt, noch für das Pathogen.

Im Magen von Menschen die eine asymptomatische Infektion haben, werden stattdessen *H. pylori* spezifische T_H0 -Zellen nachgewiesen, die in ihrem sezerniertem Zytokinmuster sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Zellen entsprechen (Typ2 T-Helferzellen) (D'Elis *et al.*, 1997). Während T_H1 -Zellen wichtig für die Abwehr intrazellulärer Bakterien sind, bestimmen T_H2 -Zellen die humorale Immunantwort mit und repräsentieren wichtige Marker für die Bekämpfung extrazellulärer Bakterien. Durch das ausgeglichene Verhältnis der verschiedenen T-Zell Populationen kommt es bei asymptomatischen Infektionen nicht zu einer starken Schädigung des Gewebes und deshalb auch nicht zu der Entstehung ernsthafter Krankheiten. Dies hebt her-

vor wie wichtig die Erforschung von Wirtszellfaktoren ist, die die Pathogenese in *H. pylori* infizierten Patienten mitbestimmen.

Der Verlauf der Immunantwort des Wirts wird aber neben wirtszellspezifischen Faktoren, wie beispielweise der individuellen genetischen Disposition, ebenfalls sehr stark von der Expression bakterieller Virulenzfaktoren beeinflusst, die Thema des nächsten Abschnitts sind.

1.4. Bakterielle Virulenzfaktoren

1.4.1. Urease, Flagellen und Adhäsine

Die kolonisierenden Bakterien befinden sich normalerweise innerhalb der ersten 15 µm der Magenmukosa oberhalb des Epithels (Juxtamukosa), da sie in dem sauren Milieu des Magenumens nicht lange überlebensfähig sind (Montecucco und Rappuoli, 2001;Schreiber *et al.*, 2004). Um in den Mukus zu gelangen, sind vor allem zwei Virulenzfaktoren von entscheidender Bedeutung: das Metalloenzym Urease und Flagellen, mit denen sich die Bakterien fortbewegen. Die Urease wird von den Bakterien sekretiert (**Abb. 1.4**) und katalysiert die Spaltung von Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak (NH_3). Der Ammoniak reagiert wiederum mit Protonen (H^+) zu Ammonium (NH_4^+) und steigert so den pH-Wert des extrazellulären Milieus. Diese Veränderungen schützen das Bakterium vor einer zu sauren Umgebung und erleichtern ihm die Kolonisierung (Hong *et al.*, 2003;Stingl *et al.*, 2002;Weeks *et al.*, 2000).

Nur ein geringer Anteil der Bakterien adhäriert am Epithel und löst dort zahlreiche Wirtszell-Prozesse aus. Für die Adhäsion nutzt *H. pylori* eine große Anzahl verschiedenster Adhäsine wie AlpA/B, BabA, SabA/B, HopZ und HorB (Beswick *et al.*, 2006b;Snelling *et al.*, 2007). Diese bakteriellen Oberflächenproteine binden u.a. an fucosylierte und sialylierte Blutgruppenantigene der Zellen und vermitteln dem Bakterium aufgrund ihrer großen Anzahl verschiedene Bindungsmöglichkeiten, durch die sie sich schnell an Veränderungen der äußeren Epithelschicht anpassen können. Da viele pathogene Prozesse von einer erfolgreichen Adhäsion der Bakterien an das Epithel abhängen, werden auch Adhäsine zu den Virulenzfaktoren gezählt.

1.4.2. Der sekretierte Autotransporter VacA

Neben Urease sezerniert *H. pylori* einen weiteren bakteriellen Virulenzfaktor, das vakuolisierende Zytotoxin A (VacA). Das 95 kDa große hexamerbildende Protein spielt in der Pathogenese von *H. pylori* Infektionen eine große Rolle, da es als Hauptverursacher der Ulzeration den Krankheitsverlauf entscheidend mitbestimmt (**Abb. 1.4**). Als klassisches AB-Toxin dringt es in die Wirtszellen ein und induziert dort die Bildung von zytoplasmatischen Vakuolen und Apoptose (Cover und Blaser, 1992;Galmiche *et al.*, 2000;Tombola *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass VacA exprimierende Bakterien einen klaren Kolonisierungsvorteil besitzen (Salama *et al.*, 2007).

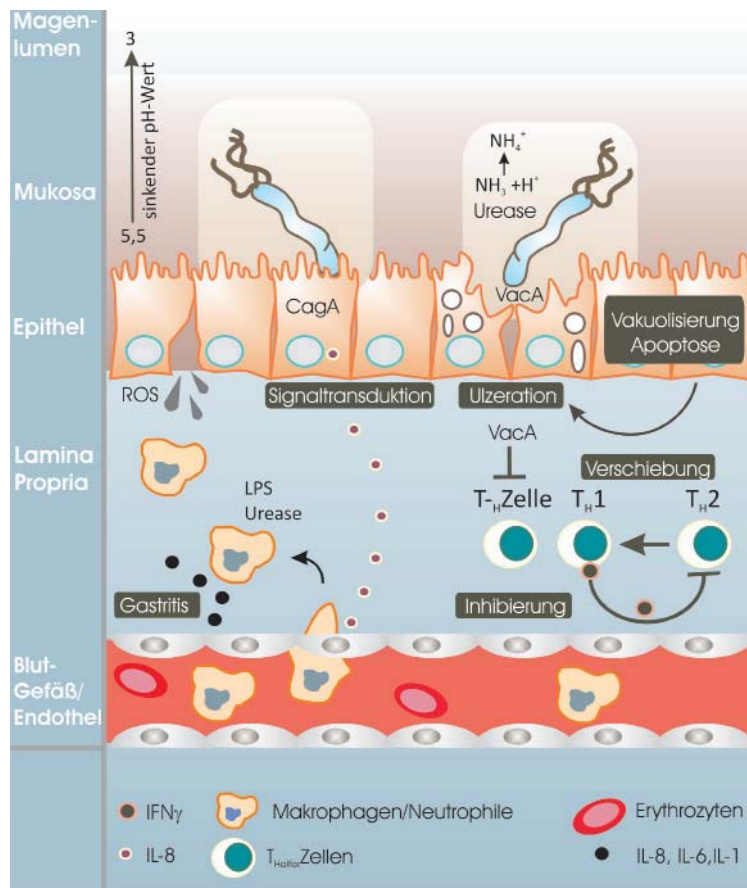


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge während einer *H. pylori* Infektion.

Die vorwiegend im Magenmukus siedelnden Bakterien gelangen mit Hilfe ihrer Flagellen an das Magenepithel, wo sie adhären. Um der sauren Umgebung im Magen zu entgehen, synthetisiert *H. pylori* das Enzym Urease, das Ammoniak produziert. Das sezernierte VacA ruft eine Vakuolisierung der Zellen hervor und begünstigt so die Ulkusbildung. Zusätzlich kann VacA die T-Zell Proliferation unterdrücken. Entartete, infizierte Zellen zeigen häufig eine Verschiebung des T-Zell Gleichgewichts in Richtung T_H1 . Mit dem Typ IV Sekretionssystem transloziert *H. pylori* die Effektoren CagA und Peptidoglycan. Die so initiierte Signaltransduktion führt zu der Expression und Sekretion des Zytokins IL-8, welches Makrophagen und Neutrophile in das infizierte Gewebe einwandern lässt. Die von Makrophagen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise Stickoxid (NO) führen bei langanhaltenden Infektionen zu Gewebsschädigungen.

Es gibt drei Genotypen des Proteins, deren zytotoxische Aktivität mit der Ausprägung des jeweiligen Krankheitsbildes korreliert (Atherton *et al.*, 1995; Letley und Atherton, 2000). Die genetischen Unterschiede werden durch die Anwesenheit von drei verschiedenen Signalsequenzen (s1a, s1b, s2) und zwei Familien von Allelen manifestiert (m1 und m2). Während *H. pylori* Stämme, die die Signalsequenz s2 exprimieren, nur eine schwache Zytotoxizität aufweisen, rufen Stämme mit dem Genotyp s1/m1 eine starke Vakuolisierung der Zellen hervor. Interessanterweise ist die Anwesenheit des Genotyps s1/m1 epidemiologisch mit dem Vorhandensein des bakteriellen Faktors CagA (*cytotoxin-associated gene A*) verknüpft, der ebenfalls mit einer hohen Pathogenität in Verbindung steht (Atherton *et al.*, 1995). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass sich beide Virulenzfaktoren gegenseitig inhibieren, um so ihre zytotoxischen Eigenschaften kontrollieren zu können (Argent *et al.*, 2008).

1.4.3. Die *cag* Pathogenitätsinsel

Ein weiterer Virulenzfaktorkomplex, der eng mit dem Krankheitsverlauf *H. pylori* infizierter Patienten assoziiert ist, wurde 1996 identifiziert (Censini *et al.*, 1996). Hierbei handelte es sich um die Entdeckung einer genetischen Pathogenitätsinsel (PAI), die wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer in den bakteriellen chromosomalen Genlokus der Glutamat-Race-mase integriert wurde. Sequenzvergleiche ergaben, dass der 40 kb große Genomabschnitt mit ca. 31 Genen für ein Typ IV Sekretionssystem (T4SS) kodiert, mit dem *H. pylori* Effektoren

in die Wirtszelle transloziert (Abb. 1.5). Viele Gene der sogenannten *cagPAI* sind homolog zu Genen des Virulenz-(*vir*) Operons von *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) (Abb. 1.5). Das Pflanzenpathogen nutzt das auf dem Operon kodierte, nadelförmige T4SS für die Injektion von Transfer (T)-DNA in die Wirtszelle (Chilton *et al.*, 1977; Zupan und Zambryski, 1995). Durch die auf der T-DNA kodierten Enzyme wird ein verstärktes Wachstum der Wirtszellen induziert, das dem Pathogen einerseits Nährstoffe zukommen lässt und andererseits zur Bildung von Pflanzentumoren führt (Van Larebeke *et al.*, 1974). Ob das T4SS von *H. pylori* auch DNA in Wirtszellen schleust, ist noch unbekannt.

Bisher konnten nur zwei Effektormoleküle identifiziert werden, die *H. pylori* durch das T4SS in humane Wirtszellen transloziert: das Effektorprotein CagA und Peptidoglycan.

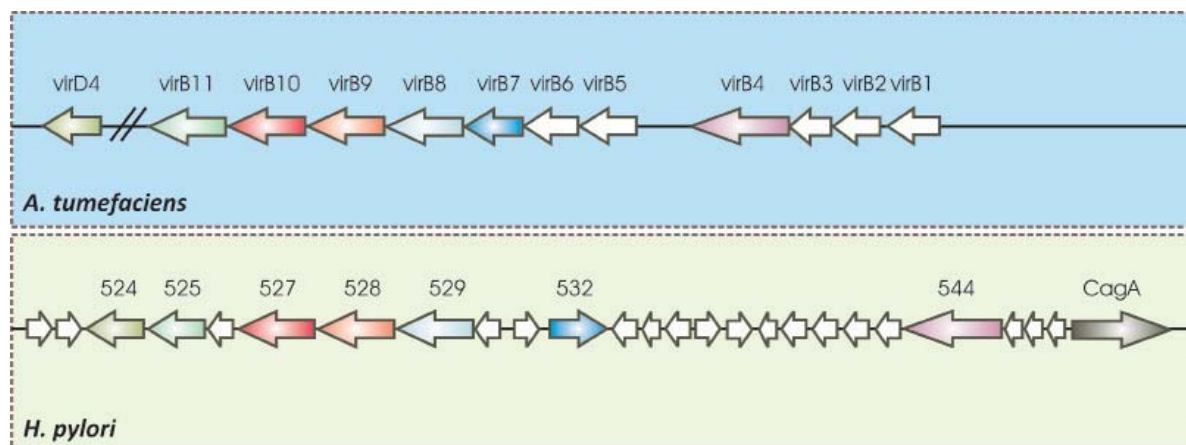


Abb. 1.5: Vergleich der Homologien zwischen den Genen der *cagPAI* von *H. pylori* und Genen des *vir* Operons von *A. tumefaciens*.

Homologe Gene sind in der gleichen Farbe dargestellt. Die Nummern beziehen sich auf *H. pylori* Gene nach der Nomenklatur von Tomb *et al.* (Tomb *et al.*, 1997). Die Gene 529 und 532 sind nicht homolog zu *virB7* und *virB8*, haben aber die gleiche Funktion (Covacci und Rappuoli, 2000).

Letzteres interagiert mit dem intrazellulären Rezeptor Nod1 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 1*) und aktiviert so den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuklearer Faktor κ B), der die Expression vieler proinflammatorischer Zytokine induziert. Dementsprechend ist die NF- κ B abhängige Zytokin-Expression in *H. pylori* infizierten Menschen weitgehend von der Expression eines funktionstüchtigen T4SS abhängig, was den Proteinkomplex zu einem Hauptvirulenzfaktor macht. Diese Eigenschaft führte zur folgenden Nomenklatur, mit der man zwei Hauptgruppen von *H. pylori* unterscheidet.

H. pylori Stämme, die sowohl VacA als auch ein funktionstüchtiges T4SS exprimieren, werden als Typ I Stämme klassifiziert, die im Gegensatz zu Typ II Stämmen eine erhöhte Pathogenität besitzen (Xiang *et al.*, 1995). Patienten, die mit Typ I Stämmen infiziert sind, entwickeln häufiger duodendale Ulkuserkrankungen und Magenkarzinome, während Typ II Infektionen meistens asymptomatisch verlaufenden (Censini *et al.*, 1996).

1.4.4. CagA, das translozierte Effektorprotein

Während *A. tumefaciens* mehrere Proteine in die Wirtszelle schleust, konnte für *H. pylori* bisher nur ein Effektorprotein identifiziert werden, das T4SS abhängig transloziert wird: CagA (Akopyants *et al.*, 1998; Backert *et al.*, 2000; Censini *et al.*, 1996; Montecucco und Rappuoli, 2001). Nach der Translokation ruft CagA drastische Veränderungen in der Wirtszelle hervor (Abb. 1.6). Hierzu gehören beispielsweise die Ausbildung einer abnormalen zellulären Elongation (*hummingbird phenotype*), die mit starken Veränderungen des Zytoskeletts assoziiert sind und eventuell auf einer CagA abhängigen Dephosphorylierung Aktin-bindender Wirtszellproteine beruht (Backert *et al.*, 2001; Moese *et al.*, 2007; Segal *et al.*, 1999; Selbach *et al.*, 2003; Selbach *et al.*, 2004). Außerdem interagiert CagA mit der PAR1/MARK Kinase, einem Zellpolarität-kontrollierendem Enzym, das durch die Interaktion nicht mehr phosphoryliert werden kann und von der Plasmamembran dissoziiert (Saadat *et al.*, 2007). Durch diesen Vorgang kommt es zu einem Verlust der Zellpolarität in infizierten Zellen (Abb. 1.6). CagA abhängige Wirtszellantworten äußern sich auch durch die Zerstörung der zellulären Adhäsion an die Matrix (Moese *et al.*, 2007) und der Zell-Zell-Verbindungen durch Interaktionen mit ZO-1 (Zonula occludens 1) (Amieva *et al.*, 2003). All diese Veränderungen sind onkogene Prozesse, die verdeutlichen, warum der Effektor CagA ein zentraler Forschungsschwerpunkt vieler Studien war und immer noch ist.

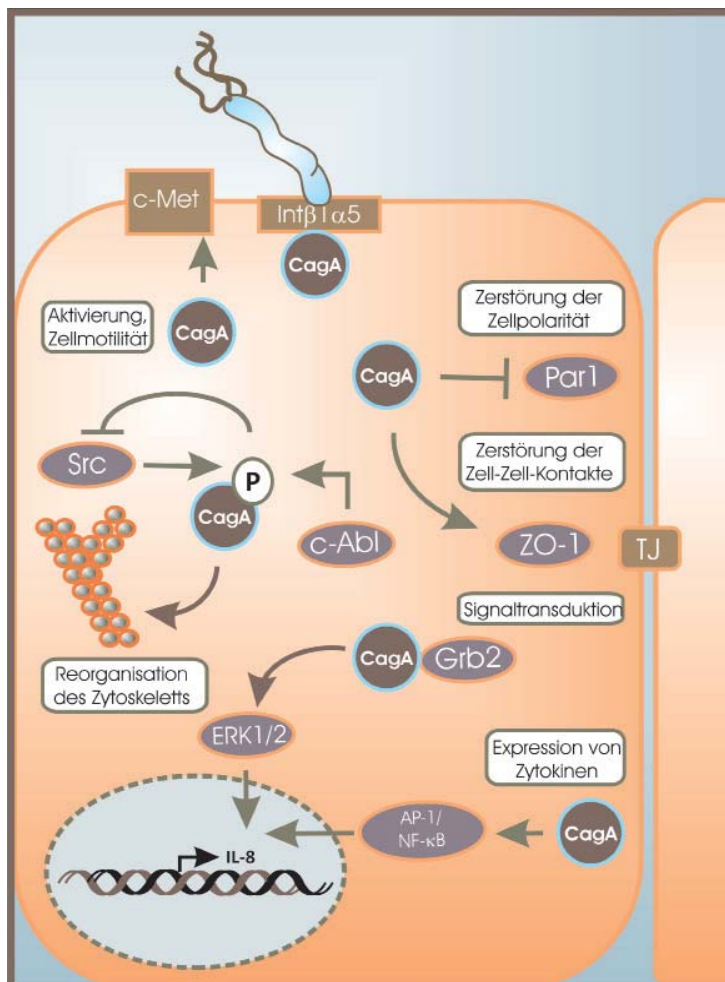


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der CagA abhängigen Wirtszellantworten während einer Infektion mit *H. pylori*.

Durch die Bindung des T4SSs an Integrin $\beta 1 \alpha 5$ kommt es zur Translokation von CagA in die Wirtszelle und zur Phosphorylierung von CagA durch Src Kinasen und c-Abl. In einem negativen Rückwirke-Mechanismus inhibiert CagA die Kinase nach einigen Stunden. Der Virulenzfaktor induziert verschiedene Prozesse, die sowohl Phosphorylierungs-abhängig als auch -unabhängig verlaufen. Sie reichen von der Zerstörung der Zellpolarität und Zell-Zell-Kontakten (TJ; *tight junctions*) durch Interaktionen mit PAR1 und ZO-1 bis zu Veränderungen des Zytoskeletts, die in der Formierung einer elongierten Zellform resultieren (*hummingbird* Phänotyp). Durch Interaktionen mit Rezeptor-Tyrosinkinasen wie c-Met oder Adapterproteinen wie Grb2 steuert CagA auch Signaltransduktionsprozesse. Dadurch wird sowohl eine erhöhte Zellmigration und Zellinvasion hervorgerufen, als auch eine mitogene Genexpression. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CagA auch die Sekretion von IL-8 induzieren kann.

Einige Wirtszellveränderungen, wie die Ausbildung des *hummingbird* Phänotyps sind mit der Phosphorylierung von CagA an spezifischen Tyrosinresten assoziiert, den sogenannten EPIYA-Regionen (Stein *et al.*, 2000). Die verschiedenen Stämme unterscheiden sich in der Art und der Anzahl dieser Sequenzmotive, von denen einige stärker mit pathogenen Vorgängen in Verbindung stehen (Naito *et al.*, 2006).

Die EPIYA-Regionen werden nach der Translokation von CagA sowohl von Src-Kinasen als auch von c-Abl phosphoryliert (Poppe *et al.*, 2007;Selbach *et al.*, 2002a;Selbach *et al.*, 2003;Stein *et al.*, 2002;Tammer *et al.*, 2007). Zusätzlich kommt es in eukaryotischen Zellen auch zur Prozessierung des Effektorproteins (Moese *et al.*, 2001). Bisher konnten jedoch noch nicht geklärt werden, warum und wodurch es zu dieser Modifikation des Proteins kommt und ob es ein bakteriell- oder Wirtszell-gesteuerter Prozess ist.

1.4.5. CagA und der EGF-Rezeptor

Obwohl bisher viele CagA abhängige Wirtszellantworten identifiziert werden konnten, ist die genaue Funktion von CagA noch weitgehend unbekannt. Da CagA mit zahlreichen Komponenten der Signaltransduktion interagiert, nimmt man an, dass es die Eigenschaften von Adapterproteinen nachahmt, um so in zahlreiche Signalwege eingreifen zu können. Unter anderem interagiert CagA mit der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met (**Abb. 1.6**), aktiviert diese und induziert so eine verstärkte Zellmotilität und Zellinvasion (Churin *et al.*, 2003;Oliveira *et al.*, 2006). CagA interagiert auch mit dem Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) und kann so den MAP-Kinase Signalweg, der zur Aktivierung der Kinasen ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*) führt, einleiten. Durch die Steuerung dieser Signaltransduktionskaskaden kann CagA wichtige zelluläre Prozesse steuern, die u.a. zur Expression von proinflammatorischen und Zellzyklus-regulierenden Proteinen führen.

Durch die Aktivierung der EGF (*epidermal growth factor*) bindenden Rezeptor-Tyrosinkinase (EGF-Rezeptor; EGFR) greift CagA neben der Interaktion mit Grb2 und c-Met auch auf einem anderen Weg in einen der wichtigsten zellulären Signaltransduktionsprozesse ein. Untersuchungen des EGF-Rezeptor Signalwegs innerhalb der ersten Stunden nach der Infektion konnten zeigen, dass *H. pylori* den Rezeptor transaktiviert und dadurch die Expression EGF-Rezeptor abhängiger Gene initiiert wird (Keates *et al.*, 2005;Keates *et al.*, 2007;Wallasch *et al.*, 2002).

Die Bindung von spezifischen Liganden an den EGF-Rezeptor induziert eine Homo-und/oder Heterodimerisierung des Rezeptors, die zur Autophosphorylierung seiner zytoplasmatischen Domäne führt (Hubbard und Miller, 2007;Yarden und Schlessinger, 1987). Diese Rezeptor-Transaktivierung führt zur Rekrutierung von Adapterproteinen und/oder Enzymen, die die Signalkaskade weiterführen (Ullrich und Schlessinger, 1990). Dadurch kontrolliert der EGF-Rezeptor wichtige zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Zelltod und Zellmotilität (Yarden und Slivkowski, 2001), die hauptsächlich über vier unterschiedliche Signalwege vermittelt wer-

den: die ERK1/2-, die Jak/STAT-, die PLC γ /PKC- und die PI3K/AKT-Kaskade (**Abb. 1.7**).

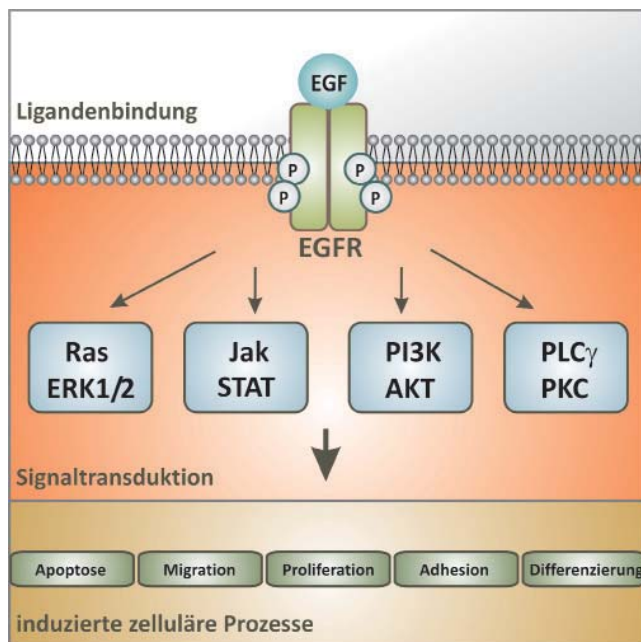


Abb. 1.7: Modell der EGF-Rezeptor Signalkaskade.

Nach der EGF abhängigen Transaktivierung des EGF-Rezeptors leitet dieser unterschiedliche Signalwege ein. Zu den bekanntesten gehören die ERK1/2-, die Jak/STAT- und die PI3K/AKT-Signalkaskade. Nach ihrer Aktivierung vermitteln sie weitere Aktivierungskaskaden, die zu einem breiten Spektrum an zellulären Antworten wie Proliferation und Differenzierung führen.

Aufgrund dieses breiten Wirkungsspektrums können bereits kleinste Störungen der Signalkaskade unkontrolliertes Zellwachstum hervorrufen, welches wiederum zur Entstehung von Krebs oder Geschwüren führen kann (Gusterson *et al.*, 1984; Konturek *et al.*, 1990; Moscatello *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1992).

Demzufolge führte die beobachtete CagA abhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors zu der Hypothese, dass CagA durch die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, die die zelluläre Proliferation steuern, onkogene Prozesse induziert. Diese können Zellen transformieren und möglicherweise so die Entstehung von Tumoren begünstigen. Die auf dieser Hypothese basierenden Studien wurden allerdings in frühen Infektionsstadien (0-3 h) durchgeführt und lassen somit die Frage offen, ob sich die beobachteten Effekte auch nach längeren Infektionsperioden zeigen. Dies rückt die Assoziation zwischen *H. pylori* und EGF-Rezeptor in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen und ist deshalb ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

2. Zielsetzungen

2.1. Analyse zellinienspezifischer, Typ IV Sekretionssystem abhängiger Wirtszellantworten

Die detaillierte Erforschung der Wirt-Pathogen Interaktion bildet die Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der infektionsbiologischen Forschung. Hierbei stehen nicht nur bakterielle sondern auch wirtszellspezifische Prozesse im Vordergrund. Da der Einfluss von Wirtszelldeterminanten auf die *H. pylori* induzierte Pathogenese bisher noch nicht systematisch untersucht wurde, sollten in der vorliegenden Arbeit bekannte eukaryotische Prozesse untersucht werden, die gezielt durch das T4SS ausgelöst werden, welches eng mit der Entstehung schwerer Krankheiten in Verbindung steht. Dazu gehören sowohl die Translokationseffizienz und Prozessierung von CagA, die CagA abhängige Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen, die Sekretion von IL-8 und strukturelle Veränderungen der Zellform. Um analysieren zu können welche T4SS abhängigen Effekte in ihrer Ausprägung von wirtszellspezifischen Faktoren reguliert werden, sollten 19 verschiedene Säugetierzelllinien infiziert und überprüft werden. Die Zelllinien weisen aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft unterschiedliche Proteinexpressionsmuster auf. Zeigen sie unterschiedlich starke Phänotypen, spricht das für eine wichtige Rolle von Wirtszellfaktoren in dem jeweiligen Prozess. Diese Abweichungen ermöglichen es, die Abhängigkeit von T4SS spezifischen Prozessen und Wirtszellfaktoren das erste Mal systematisch auf molekularer Ebene zu untersuchen.

2.2. Funktionale Analyse des Effektors CagA - Wie CagA den EGF-Rezeptor kontrolliert und manipuliert

Obwohl viele Studien darauf hindeuten, dass CagA als Adapterprotein agiert und auf diesem Wege in wichtige Signaltransduktionsprozesse eingreift, ist die genaue Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt. Da CagA eine Schlüsselrolle in der Pathogenese einnimmt, ist die Aufklärung der funktionalen Zusammenhänge von CagA und Signaltransduktion von enormer medizinischer Bedeutung. Deshalb beschäftigt sich ein großer Teil der Arbeit eingehend mit CagA abhängigen Veränderungen der Signaltransduktion in infizierten Zellen. Aufgrund der zentralen Bedeutung des EGF-Rezeptors innerhalb onkogener Prozesse und aufgrund der bekannten Assoziation von CagA mit diesem Rezeptor, sollte hier der EGF-Rezeptor Signalweg näher betrachtet werden. Da die Intensität der Signalweiterleitung entscheidend von der Anzahl der exponierten Oberflächen-Rezeptoren mitbestimmt wird, wurde sowohl die EGF-Rezeptor Population auf der Zelle als auch die Rezeptor-Endozytose in infizierten Zellen analysiert. Hierbei wurde ein Beobachtungszeitpunkt nach längeren Infektionsperioden gewählt (20 h), um so noch unbekannte längerfristige Auswirkungen einer *H. pylori* Infektion erfassen

zu können. Da Veränderungen der EGF-Rezeptor Signaltransduktion auch mit einer erhöhten Gefahr der zellulären Transformation und Neoplasie in Verbindung steht, wurden zusätzlich sowohl der Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors als auch die Signaltransduktion genauer analysiert, die während längerer Infektionsperioden vorherrschen.

2.3. Identifikation von bakteriellen NF- κ B Effektoren, Typ IV Sekretionssystem-Komponenten und Adhäsinen von *H. pylori* durch einen genomweiten bakteriellen *Screen*

Bisher sind nur zwei Effektor-Moleküle bekannt, die durch das T4SS transloziert werden. Auch die genaue Komposition des T4SSs selbst ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine genomweite Rasterstudie (*Screen*) entwickelt werden, durch die sowohl die Identifikation von neuen translozierten Effektoren als auch die Entdeckung von T4SS assoziierten Proteinen möglich wird. Hierfür wurde eine der prominentesten T4SS abhängigen Wirtzellantworten als Auslesemechanismus (*Read-Out*) verwendet: die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser Prozess hängt von einer erfolgreichen Adhäsion ans Epithel, von einem funktionstüchtigen T4SS und-sehr wahrscheinlich-von der Translokation eines unbekannten Effektors ab. Anhand einer humanen NF- κ B Reporterzelllinie, sollen durch die Hochdurchsatz-Analyse einer genomweiten bakteriellen Mutanten-Bibliothek, neben neuen Effektoren und unbekannten T4SS Komponenten auch bakterielle Adhäsine identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Studie werden nicht nur das molekulare Verständnis der *H. pylori* induzierten proinflammatorischen Antwort, sondern auch die Möglichkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze vergrößern.

3. Analyse zelllinienspezifischer, Typ IV Sekretionssystem abhängiger Wirtszellantworten

Ein wichtiger Faktor, der den Krankheitsverlauf einer *H. pylori* Infektion entscheidend beeinflusst mitbestimmt, ist die proinflammatorische Reaktion des Wirts. Dieser Prozess wird entscheidend von der Expression eines funktionstüchtigen T4SSs mitgeprägt (Crabtree *et al.*, 1999;Panchal *et al.*, 2003;Selbach *et al.*, 2002b). Es induziert die Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die als Hauptverursacher für die in *H. pylori* Patienten auftretende chronische Gastritis diskutiert werden (Crabtree *et al.*, 1994;Crabtree und Farmer, 1995;Shimoyama und Crabtree, 1997). Außerdem vermittelt es die Translokation des Effektors CagA in die Wirtszellen, der dort sowohl die Dephosphorylierung verschiedener Wirtszellproteine als auch morphologische Veränderungen induziert, die zur Ausbildung einer starken Elongation der Zellen führen (Censini *et al.*, 2001;Selbach *et al.*, 2003;Selbach *et al.*, 2004).

Funktionelle Analysen verschiedener *H. pylori* Stämme, in denen einzelne Gene der *cagPAI* deletiert wurden, zeigten, dass die meisten Genprodukte der Pathogenitätsinsel benötigt werden, um eine volle Funktionalität des T4SSs zu gewährleisten (Backert *et al.*, 2004;Fischer *et al.*, 2001;Selbach *et al.*, 2002b). Eine systematische Analyse von Wirtszellfaktoren, die die Auswirkungen T4SS vermittelter zellulärer Prozesse mitbestimmen, wurde bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Da verschiedene Forschungsarbeiten vermuten lassen, dass wirtszellspezifische Unterschiede (genetische Faktoren, Lebensgewohnheiten, etc.) den Verlauf der *H. pylori* induzierten Pathogenese entscheidend mitbestimmen, ist eine systematische Untersuchung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze jedoch von enormer medizinischer Bedeutung (Hamajima *et al.*, 2006;Koivisto *et al.*, 2008).

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß wirtszellspezifische Faktoren in die Ausprägung T4SS induzierter Prozesse involviert sind, und zu welchem Zeitpunkt der Infektion sie regulatorische Funktionen übernehmen können, sollten in der vorliegenden Studie 19 unterschiedliche Säugetierzelllinien mit *H. pylori* infiziert und auf verschiedene T4SS abhängige Wirtszellantworten untersucht werden. Die Zelllinien weisen aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft verschiedene Protein-Expressionsmuster auf und ermöglichen so durch einen systematischen Vergleich ihrer T4SS abhängigen Wirtszellantworten, den Einfluss wirtszellabhängiger Prozesse im T4SS induzierten Infektionsverlauf zu untersuchen. Für die Analyse wurden Wirtszellantworten gewählt, die in der humanen gastrischen Epithelzelllinie AGS bereits als T4SS spezifisch identifiziert werden konnten. Diese Prozesse können in ihrem Auftreten einem bestimmten Zeitpunkt während des Infektionsprozesses zugeordnet werden. Demzufolge ermöglicht ihre Untersuchung nicht nur die Aufklärung welchen Einfluss wirtszellspezifische Faktoren auf die Intensität dieser Wirtszellantworten haben, sondern auch zu welchem Zeitpunkt der Infektion der Einfluss wirtszellspezifischer Faktoren wichtig wird.

Mit der vorliegenden Untersuchung wird das erste Mal eine systematische Analyse T4SS abhängiger Wirtszellantworten präsentiert, deren Ergebnisse die Wichtigkeit eukaryotischer

Faktoren in *H. pylori* induzierten Infektionsprozessen auf molekularer Ebene hervorheben soll. Die Identifikation dieser wirtszellspezifischen Faktoren wird nicht nur neue Einblicke in die Wirt-Pathogen Interaktion liefern, sondern auch die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ermöglichen, die diese Faktoren gezielt miteinbeziehen. Die Ergebnisse der Analyse sind zur Übersicht in **Tab. 1** auf [Seite 37](#) zusammengefasst.

3.1. Die T4SS vermittelte Translokation von CagA

Da CagA erst nach dem Transfer in die Wirtszelle von zellulären Kinasen Tyrosin-phosphoryliert wird, kann eine erfolgreiche Translokation des Effektors anhand seines Phosphorylierungs-Status untersucht werden (Segal *et al.*, 1999). Der Transfer von CagA gehört zu den prominentesten Prozessen, die durch das T4SS vermittelt werden. Um zu ermitteln in welchem Ausmaß dieses Ereignis von Wirtszellfaktoren bestimmt wird, sollte die Translokationseffizienz in dieser Studie untersucht werden. Für die Analyse wurden 19 unterschiedliche Zelllinien 20 h mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA behandelt, die kein CagA exprimiert (**Abb. 3.1**). Da *H. pylori* sehr fest an infizierten Zellen adhäriert, wurden die Bakterien zusammen mit den infizierten Zellen in Lysepuffer aufgenommen. So konnte im Immunoblot unter Verwendung eines allgemeinen Phosphotyrosin- und eines spezifischen CagA-Antikörpers sowohl der Phosphorylierungs-Status von CagA als auch die Menge der adhärierenden Bakterien nachgewiesen werden (**Abb. 3.1B**). Unterschiedlich starke Adhäsionen der Bakterien an die Zellen konnten so als mögliche Ursache für unterschiedliche Translokationseffizienzen ausgeschlossen werden. Eine repräsentative Auswahl der Zelllinien, die getestet wurden, ist in **Abb. 3.1** zu sehen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Zelllinien ist in **Tabelle 1** dargestellt (siehe [Seite 37](#)).

Den Beobachtungen zur Folge unterschied sich die Translokationseffizienz von CagA zwischen den untersuchten Zelllinien stark voneinander, unabhängig davon ob sie humanen oder tierischen Ursprungs waren. Die humane gastrischen Epithelzelllinie AGS repräsentiert die natürliche Wirtszelle für *H. pylori*. Sie zeigte eine starke CagA-Phosphorylierung (**Abb. 3.1A**). Im Gegensatz dazu konnte in der humanen Cervix-Karzinom Zelllinie (HeLa) eine signifikant schwächere CagA-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Diese Zelllinie stammt nicht aus dem menschlichen Magen, wurde aber aus dem gleichen Gewebetyp (Schleimhaut des Gebärmutterhalses) kultiviert. In Mausfibroblasten (Syf + Src), welche die CagA-phosphorylierende Kinase c-Src überexprimieren und so im Gegensatz zu normalen Syf-Zellen in der Lage sind, CagA zu phosphorylieren, war die Tyrosin-Phosphorylierung von CagA kaum mehr zu erkennen. Es konnten ebenfalls Zelllinien identifiziert werden, in denen keine CagA-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Hierzu gehörten u.a. die humane Lungenkarzinomzelllinie GLC4 und die Zelllinie MDCK, die dem Nierenepithel eines Hundes entstammt.

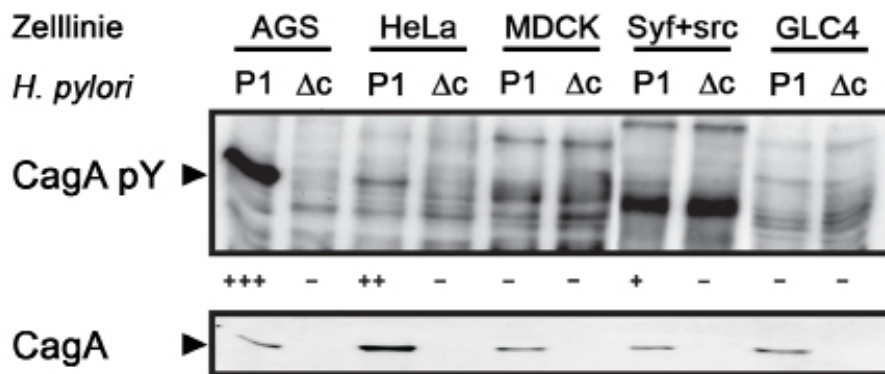


Abb. 3.1: Immunoblotanalyse der CagA-Translokation in verschiedene *H. pylori* infizierte Zelllinien.

Die Zelllinien wurden mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 oder der isogenen Deletionsmutante P1 $\Delta cagA$ (Δc) für 20 h (MOI 100) infiziert. Die Tyrosin-Phosphorylierung von CagA wurde mit einem anti Phosphotyrosin-Antikörper ermittelt (oben). B: Die Adhärenz der Bakterien wurde mit einem anti CagA-Antikörper überprüft, der sowohl transloziertes als auch nicht-transloziertes CagA der adhärenzenden Bakterien detektiert (unten). Die Intensität der CagA Phosphorylierung ist mit „+“ und „-“ Symbolen gekennzeichnet.

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in der CagA-Phosphorylierung auf unterschiedlich starke Kinase-Aktivitäten in den verschiedenen Zelllinien beruht, wurde die Kinase-Aktivität aller Zelllinien durch *in vitro* Phosphorylierungs-Experimente untersucht (Abb. 3.2).

Hierfür wurden Wirtszell-Lysate mit Lysat des *H. pylori* Stamms P1 unter ATP Zugabe 5 min bei 30°C inkubiert. Die Phosphorylierung von CagA wurde anschließend mittels Immunoblot überprüft. Als Kontrolle wurden die Wirtszell-Lysate ebenfalls mit Lysaten der isogenen Deletionsmutante P1 $\Delta cagA$ inkubiert.

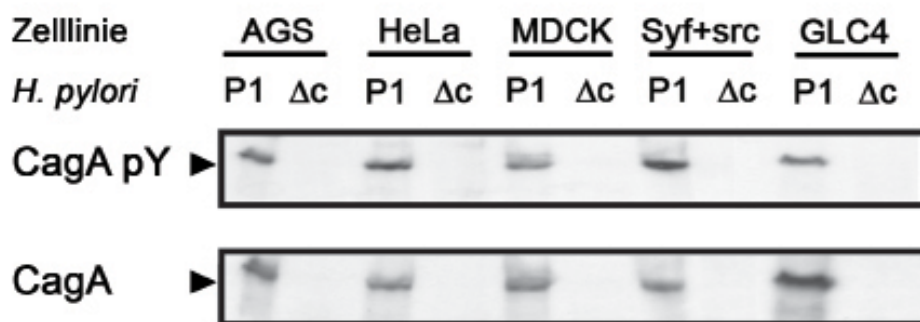


Abb. 3.2: In vitro Phosphorylierung von CagA mit Lysat aus unterschiedlichen Zelllinien.

Die Lysate der verschiedenen Zelllinien wurden jeweils mit den bakteriellen Lysaten der *H. pylori* Stämme P1 oder P1 $\Delta cagA$ (Δc) vereinigt und unter ATP-Zugabe 5 min bei 30°C inkubiert. Die Intensität der CagA-Phosphorylierung wurde per Immunoblot unter Verwendung eines anti Phosphotyrosin-Antikörpers (anti PY) analysiert (Pfeile). Als Ladekontrolle wurde der Gehalt an CagA mittels eines CagA-spezifischen Antikörpers ermittelt (anti CagA).

Da alle getesteten Zelllinien CagA phosphorylieren konnten (Tab. 1), kann man daraus schließen, dass alle Zelllinien eine vergleichbare Kinase-Aktivität besitzen. Die beobachteten CagA-Phosphorylierungsunterschiede in den untersuchten Zelllinien (Abb. 3.1) können demzufolge tatsächlich auf eine unterschiedliche Translokationseffizienz zurückgeführt werden. Da sich die experimentellen Ansätze nur aufgrund des Einsatzes unterschiedlicher Wirtszelllinien unterschieden und trotzdem starke Schwankungen der CagA Translokationseffizienz zeig-

ten, deutet dies darauf hin, dass ein oder mehrere limitierende Wirtszellfaktoren existieren, die die Funktionalität des T4SSs bereits während der Translokation von CagA entscheidend mitbestimmen.

3.2. Die Prozessierung von CagA in *H. pylori* infizierten Zellen

CagA wird kurz nach der Translokation in phagozytische Zellen proteolytisch in kleinere Fragmente prozessiert (Moese *et al.*, 2001; Odenbreit *et al.*, 2001). Hierbei entstehen zwei Proteinfragmente, von denen das Kleinere 35 – 45 kDa (je nach Wildtyp-Stamm) und das Größere ca. 110 kDa groß ist. Bisher ist nicht bekannt, ob die Prozessierung von CagA nur in phagozytischen Zellen auftritt. Auch die Funktion dieses Phänomens konnte noch nicht aufgeklärt werden. Um neue Informationen über diesen T4SS abhängigen Vorgang zu erhalten, wurde die Prozessierung des Effektors in die vorliegende Analyse miteinbezogen. Die Zelllinien wurden mit dem *H. pylori* Stamm P1 infiziert und mittels Immunoblot unter Einsatz eines CagA spezifischen Antikörpers untersucht. Um auch den Phosphorylierungs-Status der CagA Fragmente untersuchen zu können, wurde ebenfalls ein Phosphotyrosin-spezifischer Antikörper verwendet.

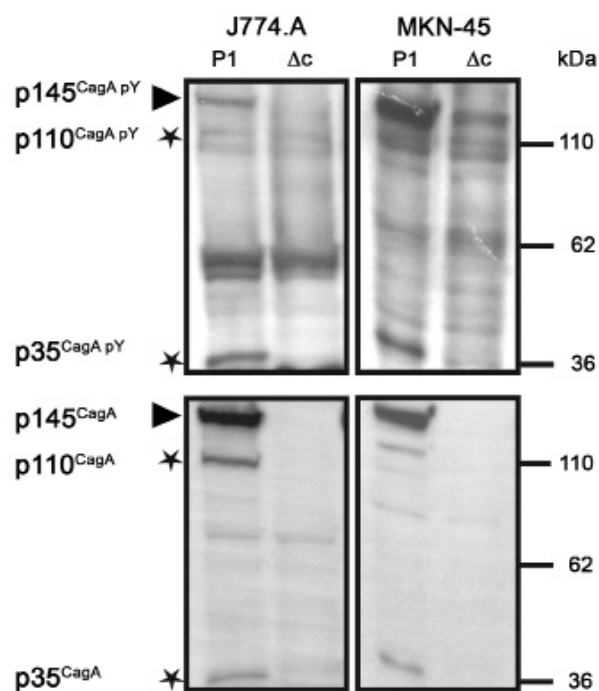


Abb. 3.3: Immunoblotanalyse der CagA-Prozessierung in der Makrophagen-Zelllinie J774.A und der Epithelzelllinie MKN-45 Zellen nach der Infektion mit *H. pylori*.

Die beiden Zelllinien wurden 20 h mit P1 oder der isogenen Deletionsmutante P1ΔcagA (Δc) infiziert (MOI 100). Die Tyrosin-Phosphorylierung und die Prozessierung von CagA wurden mit einem anti Phosphotyrosin-(oben) und einem anti CagA-Antikörper (unten) analysiert. Das unprozessierte CagA-Protein ist mit einem Pfeil markiert, die prozessierten kleineren Fragmente sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Wie erwartet konnte das p35^{cagA} Fragment sowohl in einer murinen (J774.A) als auch in einer humanen (THP1) phagozytischen Zelllinie (Makrophagen) nachgewiesen werden (Abb. 3.3; Stern). Dennoch zeigte

auch die humane Epithelzelllinie MKN-45 eine Prozessierung von CagA. In allen anderen getesteten Zelllinien konnte keine Fragmentierung von CagA detektiert werden.

Eine weitere Beobachtung basierte darauf, dass sowohl das unprozessierte CagA (Abb. 3.3; Pfeil) als auch die Fragmente des Proteins (Abb. 3.3; Stern) Tyrosin-phosphoryliert werden. Dies deutet darauf hin, dass CagA im C-terminalen Bereich des Proteins geschnitten wird, da

sich dort die multiplen Phosphorylierungsstellen von CagA befinden (Odenbreit *et al.*, 2000). Interessanterweise kann mit diesen Ergebnissen das erste Mal eine Prozessierung von CagA in Epithelzellen nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die dafür verantwortliche Protease nicht nur in phagozytischen Zellen zu finden ist. Die Bedeutung dieses Effekts scheint sich demnach nicht ausschließlich auf Immunzellen zu beziehen. Da nur einige wenige Zelllinien die Prozessierung zeigen, scheint dieser Effekt ebenfalls ein T4SS abhängiger Prozess zu sein, bei dem Wirtszellproteine eine entscheidende Rolle spielen.

3.3. Die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen

Nach der Phosphorylierung interagiert CagA mit der Phosphatase SHP-2 und der Kinase Csk (Carboxy-terminal Src kinase) (Higashi *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2003). Dies führt zu einer Inhibierung von Src und zu einer CagA abhängigen Dephosphorylierung von Src-Substraten wie Cortactin, Vinculin und Ezrin (Moese *et al.*, 2007; Selbach *et al.*, 2003; Selbach *et al.*, 2004). Da es sich bei diesen Proteinen um Faktoren handelt, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind, nimmt man an, dass die CagA induzierte Dephosphorylierung in die zelluläre Elongation involviert ist. Diese wird durch eine verstärkte Aktin-Polymerisation begleitet. Dennoch ist die genaue Funktion dieser T4SS abhängigen Protein-Modifikation noch ungeklärt und sollte deshalb ebenfalls in die Analyse T4SS induzierter Wirtszellantworten mit aufgenommen werden.

Nach der Infektion mit dem *H. pylori* Stamm P1 oder der isogenen Mutante P1 Δ cagA wurden die Zelllysate mittels Immunoblot unter Verwendung eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers auf die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen überprüft. Nur sieben der 19 getesteten Zelllinien zeigten eine Dephosphorylierung, von denen vier in Abb. 3.4 abgebildet sind.

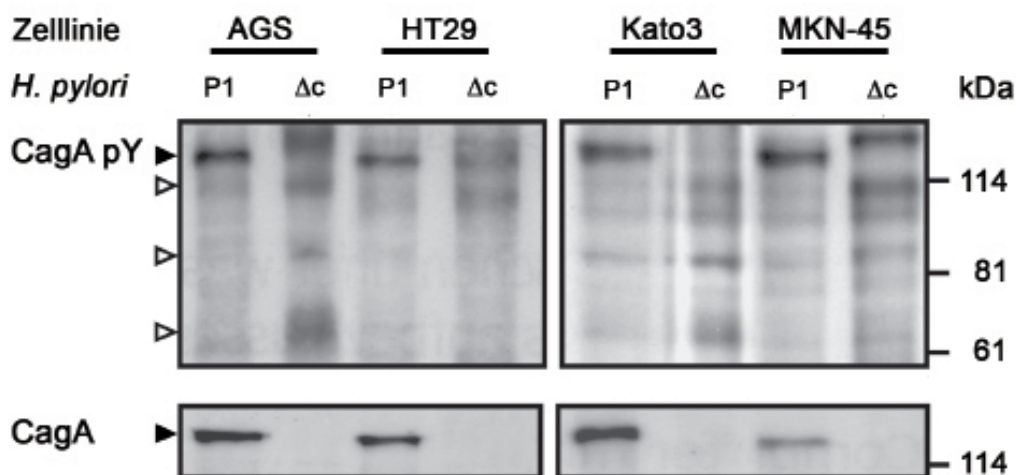


Abb. 3.4: Immunoblotanalyse der Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen in *H. pylori* infizierten Zellen. AGS-, HT29-, Kato3- und MKN-45-Zellen wurden 20 h mit P1 oder P1 Δ cagA (Δ c) infiziert (MOI 100). Der Nachweis von dephosphorylierten Proteinen erfolgte per Immunoblot unter Verwendung eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers (oben). Als Kontrolle wurde der Gehalt von CagA mittels eines anti CagA-Antikörpers bestimmt (unten). Die hellen Pfeile markieren dephosphorylierte Proteine.

Die Dephosphorylierung konnte sowohl in humanen gastrischen Epithelzellen (AGS, MKN45, Kato3) als auch in humanen nichtgastrischen Zellen unterschiedlicher Herkunft (HT29, Hec1.b, 293T, HepG2) beobachtet werden (siehe auch **Tab. 1**). Bemerkenswert ist hierbei, dass die Dephosphorylierung in keiner tierischen Zelllinie auftrat. Außerdem konnte die Dephosphorylierung auch in keiner Zelllinie beobachtet werden, in der keine CagA Translokation zu erkennen war (**Abb. 3.1**; GLC4). Zusammen mit der Beobachtung, dass die Dephosphorylierung in Zellen die mit P1 Δ cagA infiziert wurden auch nicht detektiert wurde, lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen CagA abhängig ist und demzufolge mit der CagA induzierten Inaktivierung von Src im Zusammenhang stehen könnte. Dass die Zelllinie GLC4, in der ebenfalls keine CagA Translokation nachgewiesen werden konnte, ebenfalls keine Dephosphorylierung zeigt, unterstützt diese Hypothese. Da jedoch auch Zellen identifiziert werden konnten, die zwar eine erfolgreiche CagA Translokation (z.B. MKN-28) aber keine Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen zeigten, scheint die Effektor-Translokation nicht der alleinige Induktor für den beobachteten Effekt zu sein. Demnach scheinen Wirtszelldeterminanten auch bei dieser T4SS vermittelten Reaktion den Verlauf des Prozesses zu kontrollieren.

3.4. Morphologische Veränderungen von *H. pylori* infizierten Zellen

Eine der beeindruckendsten CagA abhängigen Wirtszellantworten, die bei AGS Zellen beobachtet werden kann, ist eine starke zelluläre Elongation, die von einer hohen Zellmotilität begleitet wird (Segal *et al.*, 1999). Bisher ist nicht bekannt, ob sich dieser Phänotyp auch während der Infektion anderer Zelllinien zeigt, oder ob diese Veränderung allein auf AGS-Zellen beschränkt ist. Deshalb wurde die Untersuchung dieser T4SS abhängigen Wirtszellantwort in diese Studie miteinbezogen. Für die Analyse wurden alle 19 Zelllinien 20 h nach der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm P1 mikroskopisch auf Veränderungen ihrer Zellform untersucht. Eine repräsentative Auswahl ist in **Abb. 3.5** zu sehen.

Nur zwei der 19 Zelllinien zeigten eine deutliche morphologische Veränderung. AGS-Zellen zeichneten sich durch die Induktion des *hummingbird* Phänotyps aus, die makrophagen-ähnliche Zelllinie THP1, die in Suspension kultiviert wird, bildete nach der Infektion große Zellaggregate, die auch als homotypische Aggregation bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um eine Bindung zwischen Zellen des gleichen Zelltyps.

Interessanterweise konnten neben diesen T4SS abhängigen Veränderungen auch morphologische Unterschiede beobachtet werden, die T4SS unabhängig sind. Neben CagA exprimieren Typ I *H. pylori* Stämme auch das Effektorprotein VacA, das T4SS unabhängig in das extrazelluläre Milieu sekretiert wird, um sich in die Wirtszellmembran einzulagern (Rieder *et al.*, 2005). Dort ruft es eine Vakuolisierung der Wirtszellen hervor, die durch ihre zellschädigen-

den Eigenschaften stark zur Pathogenese beiträgt (Kodama *et al.*, 1998). Drei der untersuchten Zelllinien zeigten eine verstärkte Vakuolisierung des Zytoplasmas (Abb. 3.5). Sie konnte sowohl bei zwei humanen (MKN-28 und HT29) als auch bei einer tierischen Zelllinie (MDCK) beobachtet werden.

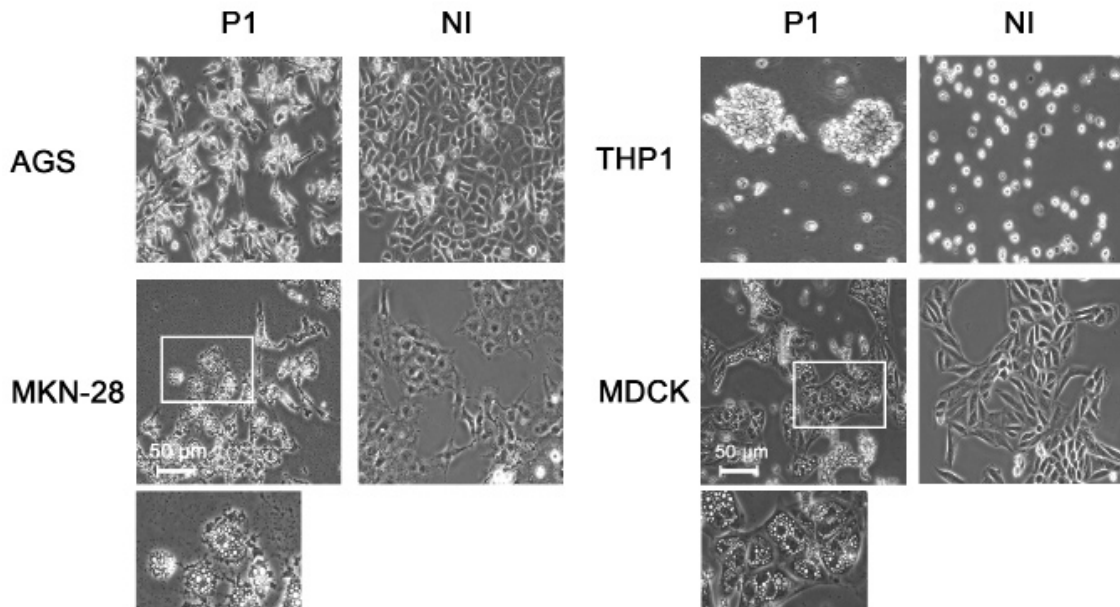


Abb. 3.5: Mikroskopische Analyse von morphologischen Veränderungen *H. pylori* infizierter Zelllinien.

Für die Analyse wurden 19 Zelllinien 20 h mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die infizierten (P1) und nicht infizierten (NI) Zellen per Phasenkontrast-Mikroskopie untersucht. Von den untersuchten Zelllinien ist nur eine Auswahl von den Zelllinien abgebildet, die morphologische Veränderungen nach der Infektion zeigten. Die Zelllinie HT29 ist hier nicht zu sehen. Die Messskala entspricht 50 µM. Um die Vakuolisierung besser erkennen zu können, sind die Bildausschnitte (weiße Kästen) von infizierten MDCK und MKN-28 Zellen vergrößert dargestellt (unterer Bildausschnitt).

Da nur fünf Zelllinien mit morphologischen Veränderungen detektiert werden konnten, scheinen gerade hier zelllinientypische Faktoren eine große Rolle zu spielen.

3.5. Die Sekretion von Chemokinen

T4SS exprimierende *H. pylori* Stämme induzieren während der Infektion eine starke proinflammatorische Reaktion der Wirtszellen, die sich beispielsweise durch die Sekretion von Chemokinen wie IL-8 äußert. Einer aktuellen Studie zur Folge geschieht dies angeblich durch eine T4SS vermittelte Translokation von Peptidoglycan in die Wirtszelle, welches dort von dem intrazellulären Rezeptor Nod1 detektiert wird. Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und Ap-1 induzieren anschließend die Expression proinflammatorischer Moleküle. Bisher wurde sowohl von einer CagA abhängigen als auch von einer CagA unabhängigen IL-8 Sekretion berichtet (Crabtree *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2006; Selbach *et al.*, 2002b). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf basieren, dass in den Studien mit verschiedenen bakteriellen Stämmen gearbeitet wurde, die sich in der Aminosäuresequenz von CagA un-

terscheiden. Diese Unterschiede können dazu führen, dass einige Stämme eine starke, andere Stämme eher eine schwache Sekretion von IL-8 induzieren (Brandt *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob sich die proinflammatorische Antwort nicht nur in Abhängigkeit des verwendeten Stammes, sondern auch in Abhängigkeit wirtszellspezifischer Faktoren unterscheidet, wurde die Intensität der proinflammatorischen Reaktion in allen humanen Zelllinien anhand der Menge von sekretiertem IL-8 bestimmt (Abb. 3.6). Da Mauszellen kein IL-8 exprimieren, wurde in murinen Zellen die Menge des IL-8 Homologs Mip-2 analysiert. Die Zellen wurden mit P1 und der T4SS Mutante P1 Δ virB11 infiziert. Anschließend wurde der Überstand der Zellen mittels ELISA analysiert.

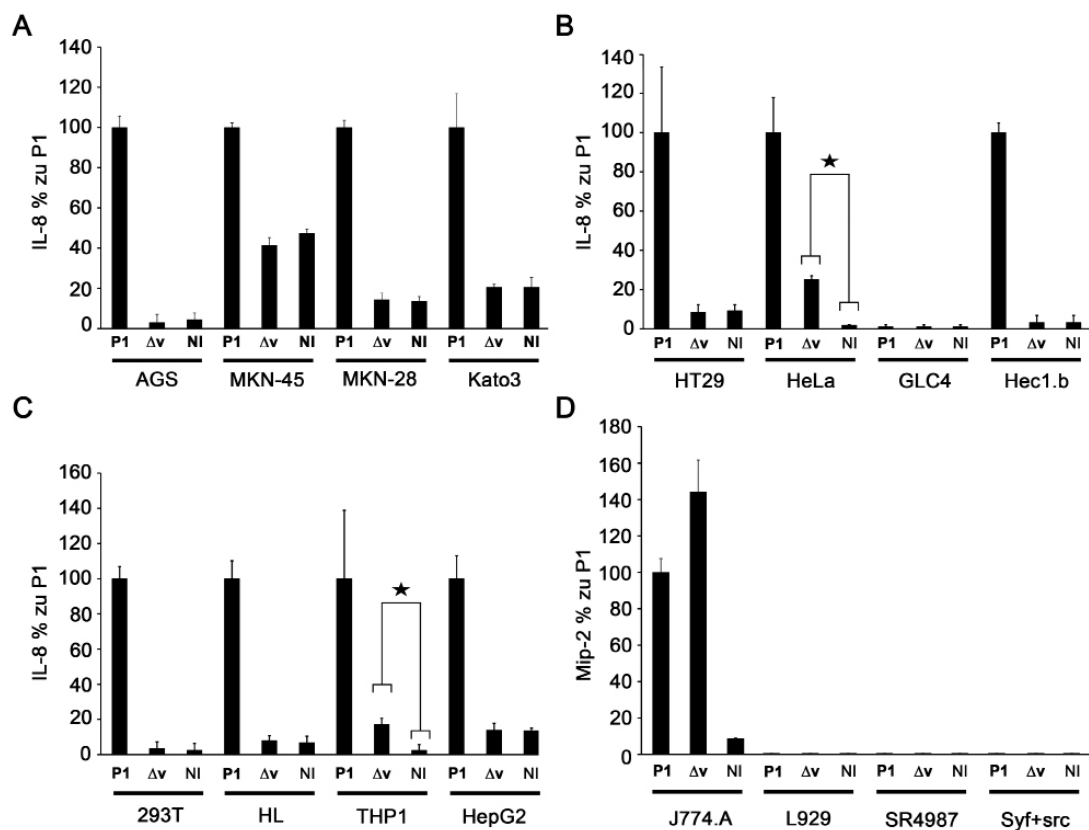


Abb. 3.6: Analyse der Chemokin-Sekretion von *H. pylori* infizierten humanen und murinen Zelllinien.

Die humanen (A-C) und murinen (D) Zellen wurden 20 h mit P1 oder der isogenen Deletionsmutante P1 Δ virB11 (Δv) infiziert (MOI 100). Die sekretierten Chemokine IL-8 und Mip-2 wurden im Überstand von infizierten und nicht infizierten (NI) Zellen mittels ELISA bestimmt. Stern: Mann-Whitney-Test für Berechnung der Signifikanz der IL-8 Sekretion in HeLa und THP1-Zellen ($p < 0.05$). Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Bis auf GLC-4 zeigten alle humanen Zelllinien eine T4SS abhängige Sekretion von IL-8 (Abb. 3.6A-C). Da bei der GLC-4 Zelllinie keine IL-8 Sekretion gemessen werden konnte und GLC-4 die einzige humane Zelllinie ist, in die nachweislich kein CagA transloziert werden kann (Abb. 3.1; Tab. 1), deuten die Daten darauf hin, dass die CagA abhängige IL-8 Sekretion in dieser Zelllinie unterbrochen ist.

Interessanterweise konnte sowohl in HeLa als auch in THP1 Zellen eine leichte, T4SS unabhängige IL-8 Sekretion beobachtet werden. Diese Zelllinien verfügen demnach über einen zusätzlichen proinflammatorischen Mechanismus. Dennoch scheint die T4SS vermittelte IL-8 Sekretion sowohl in HeLa- als auch in THP1-Zellen dominant zu sein, obwohl man synergisti-

sche Effekte beider Signaltransduktionswege hier nicht voneinander ausschließen kann.

Die Ergebnisse der Untersuchung von murinen Zellen unterschieden sich deutlich von denen humaner Zelllinien (**Abb. 3.6D**). Die Sekretion des murinen IL-8 Homologs Mip-2 konnte nur in der Maus-Makrophagen Zelllinie J774.A detektiert werden, die hier im Gegensatz zu humanen Zellen T4SS unabhängig war. Das Ergebnis steht hier nicht im Zusammenhang mit der Translokation von CagA, da bei allen untersuchten Mauszellen eine erfolgreiche CagA Translokation zu verzeichnen war (**siehe Tab. 1**). Das T4SS in murinen Zellen ist demnach zumindest in Bezug auf diese Wirtszellantwort nicht notwendig, was vor kurzem anhand von Mausinfektionen mit T4SS negativen und positiven Stämmen bestätigt werden konnte (Ferrerro *et al.*, 2008). Mit der finalen Untersuchung der Chemokin-Sekretion konnte ein weiterer T4SS abhängiger Mechanismus gefunden werden, der stark von Wirtszelldeterminanten beeinflusst wird. Da in der gesamten Studie tatsächlich kein T4SS vermittelter Prozess gefunden werden konnte, der nicht von Wirtszellfaktoren kontrolliert wird, kann man darauf schließen, dass diese Faktoren den Verlauf der Pathogenese viel mehr beeinträchtigen als bisher geahnt wurde.

Tab. 1: Ergebnisse der Analyse T4SS vermittelter Wirtszellantworten von 19 unterschiedlichen Säugetierzelllinien nach der Infektion mit dem *H. pylori* Stamm P1

Zelltyp	Zelllinie	Organismus	Gewebe	CagA-Phosphorylierung ^a	CagA-Prozessierung	Desphosphorylierung von Wirtszellproteinen	Veränderung der Zellform	IL-8 Sekretion ^b
humane gastrische Zellen	AGS	<i>H. sapiens</i>	Magen	+++	-	+	hummingbird Phänotyp	+
	MKN-45	<i>H. sapiens</i>	Magen	+++	+	+		+
	MKN-28	<i>H. sapiens</i>	Magen	++	-	-	Vakuolisierung	+
	Kato3	<i>H. sapiens</i>	Magen	+++	-	+		+
humane nicht-gastrische Zellen	HT29	<i>H. sapiens</i>	Colon	++	-	+	Vakuolisierung	+
	HeLa	<i>H. sapiens</i>	Zervix	++	-	-		+
	GLC4	<i>H. sapiens</i>	Lungen	-	-	-		-
	Hec1.b	<i>H. sapiens</i>	Endometrium	+	-	+		+
	293T	<i>H. sapiens</i>	Niere	++	-	+		+
	HL	<i>H. sapiens</i>	Lungen	++	-	-		+
	THP1	<i>H. sapiens</i>	Blut	+	+	-	Homotypische Aggregation	+
	HepG2	<i>H. sapiens</i>	Leber	++	-	+		+
	CHO K1	<i>C. griseus</i>	Ovarien	-	-	-		NB
nicht-humane nicht-gastrische Zellen	Cos-1	<i>C. sabaeus</i>	Nieren	+	-	-		NB
	J774.A	<i>M. musculus</i>	Blut	++	+	-		+(Mip-2)
	MDCK	<i>C. lupus</i>	Nieren	-	-	-		NB
	SR 4987	<i>M. musculus</i>	Knochenmark	+	-	-		-(Mip-2)
	Syf+src	<i>M. musculus</i>	Bindegewebe	+	-	-		-(Mip-2)
	L929	<i>M. musculus</i>	Bindegewebe	+	-	-		-(Mip-2)

a: Intensität der CagA-Phosphorylierung in Relation zu der Intensität in AGS-Zellen (siehe Abb.3.1 für weitere Details)

b: ein mindestens zweifacher Anstieg der IL-8-Sekretion in Relation zu der IL-8 Sekretion in der Infektion mit der P1Δ*virB11* Mutante ist als „+“ indiziert (siehe Abb.3.6). In Maus-Zellen wurde die Sekretion des IL-8 Homologs Mip-2 gemessen. Die proinflammatorische Antwort von CHO K1, MDCK und Cos-1-Zellen konnte nicht bestimmt werden (NB). Details siehe Material und Methoden

3.6. Diskussion Ergebnisteil 1

Im Gegensatz zu Typ II Stämmen exprimieren pathogene Typ I Stämme ein T4SS, das eng mit der Pathogenese in *H. pylori* infizierten Patienten assoziiert ist. Zwar sind 70-80 % aller Magentumore und ca. 90 % aller Magengeschwüre dem Magenkeim zuzuschreiben, dennoch treten diese Krankheiten nur bei ca. zehn Prozent der infizierten Patienten auf. Dies deutet darauf hin, dass die Pathogenese nicht ausschließlich von bakteriellen Faktoren, sondern auch im besonderen Maße von Wirtszelldeterminanten bestimmt wird. Dennoch ist bisher nur sehr wenig über Wirtszellfaktoren bekannt, die diese Prozesse beeinflussen können.

Um diesen Aspekt besser verstehen zu können, wurden im ersten Teil dieser Arbeit 19 verschiedene Säugetier-Zelllinien auf T4SS abhängige Wirtszellantworten untersucht. Da sich die verwendeten Zelllinien aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft in der Expression von in Frage kommenden Wirtszellfaktoren unterscheiden, konnte der Einfluss dieser Elemente so systematisch analysiert werden (siehe Tab. 1). Hierbei stellte sich heraus, dass Wirtszellfaktoren nicht nur den Verlauf der Infektion sondern auch die Intensität T4SS abhängiger Wirtszellantworten an verschiedenen Punkten der Infektion beeinflussen und kontrollieren. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte ein Modell konzipiert werden, das die Funktion von eukaryotischen Faktoren innerhalb T4SS vermittelter Prozesse genauer beschreibt und ihre Bedeutung in pathogenen Prozessen hervorhebt (Abb. 3.7).

3.6.1. Die Translokation des Effektors CagA

Da die Translokation des bakteriellen Effektors CagA in die Wirtszelle einer der wichtigsten T4SS gesteuerten Prozesse ist (Abb. 3.7A), wurde die Intensität der CagA-Phosphorylierung als Marker für die Translokationseffizienz in allen 19 Zelllinien untersucht. Hiermit sollte herausgefunden werden, ob wirtszellspezifische Faktoren an diesem besonderen Punkt der Infektion mitwirken. Die Analyse enthüllte, dass CagA nicht in allen getesteten Zelllinien phosphoryliert wird. Da die CagA-phosphorylierende Kinase Src ubiquitär exprimiert wird, konnte ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlich starke CagA-Phosphorylierung auf unterschiedliche Kinase-Populationen innerhalb der untersuchten Zelllinien basiert (Thomas und Brugge, 1997). Anhand von *in vitro* Phosphorylierungs-Experimenten konnte diese Annahme hier bestätigt werden. Demzufolge kann die unterschiedlich starke CagA-Phosphorylierung der getesteten Zelllinien tatsächlich auf eine unterschiedlich effiziente CagA Translokation zurückgeführt werden, womit die Ergebnisse die ersten konkreten Hinweise auf die Existenz eines Wirtszellrezeptors liefern, der die Funktionalität des T4SSs bereits an diesem Punkt der Infektion beeinflusst.

Dies steht wiederum im Widerspruch zu dem T4SS anderer Pathogene. So kann das Dot/Icm System von *Legionella pneumophila* Effektormoleküle z.B. sowohl in Zellen von Pro-

tozoen als auch Säugetieren translozieren, die sich in ihrem Proteinexpressionsprofil sehr stark unterscheiden (Nagai und Roy, 2003). Hier scheinen keine limitierenden Wirtszellfaktoren zu existieren. Auch die T4SS Maschinerie des Pflanzenpathogens *A. tumefaciens* kann DNA und DNA assoziierte Proteine sowohl in Pflanzenzellen als auch in humane Zellen einschleusen.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie wirtszellspezifische Faktoren die T4SS vermittelte Translokation von Effektoren kontrollieren könnten. Wirtszellfaktoren könnten beispielsweise dazu benötigt werden, das T4SS von *H. pylori* zu aktivieren. Dies könnte beispielsweise auf der Ebene der Proteinexpression gesteuert werden, wie es bei dem Typ III Sekretionssystem von *Yersinia spp.* der Fall ist (Pettersson *et al.*, 1996). Die kontinuierliche Expression von CagA auch in Abwesenheit von Wirtszellen lässt diese Möglichkeit aber als unwahrscheinlich erscheinen, so dass eine Regulation auf Translokationsebene eher zutrifft. Tatsächlich wird CagA nicht ohne bakteriellen Kontakt zur Wirtszelle sekretiert, was mit Beobachtungen des Pathogens *Shigella flexneri* übereinstimmt, bei dem Effektorproteine im Zytoplasma gespeichert werden, um bei Wirtszellkontakt transloziert werden zu können (Censini *et al.*, 2001). Vor kurzem konnte diese Hypothese durch die Identifikation von Integrin α 5 β 1 als T4SS Rezeptor tatsächlich untermauert werden (Kwok *et al.*, 2007). Durch die Bindung wird das T4SS aktiviert und transloziert CagA in die Wirtszelle. Da Integrine in polarisierten Zellen auf der basalen Seite lokalisiert sind, muss *H. pylori* erst die E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte zerstören, um so an die basale Zellseite des Epithels zu gelangen (Noach *et al.*, 1994; Weydig *et al.*, 2007). AGS-Zellen exprimieren weder E-Cadherin noch sind sie polarisiert und tragen demzufolge Integrine auf der gesamten Zelloberfläche. Da *H. pylori* in AGS Zellen demnach keine Zell-Zell-Kontakte zerstören muss um das T4SS zu aktivieren, könnte dies eine Erklärung für die hier beobachtete starke CagA-Translokation in AGS-Zellen sein. Die Ergebnisse dieser Studie lieferten demzufolge die ersten Hinweise auf den Einfluss von Wirtszellfaktoren in diesem wichtigen Infektionsprozess. Ob Integrin α 5 β 1 jedoch das einzige Oberflächenmolekül ist, das auf Wirtszellseite eine Bindung und/oder Aktivierung des T4SS vermittelt, muss noch untersucht werden. Hierbei könnte eine umfassende Analyse der hier getesteten humanen Zelllinie GLC4, die keine CagA Translokation mehr zeigt, nähere Hinweise darauf geben, ob Integrin α 5 β 1 der Schlüsselfaktor für die hier beobachteten Unterschiede der CagA Translokation ist, oder ob es eventuell noch andere Wirtszellfaktoren gibt, die die CagA Translokation beeinflussen.

3.6.2. Die Prozessierung von CagA

Nach der Translokation wird CagA nicht nur phosphoryliert sondern auch in zwei kleinere Fragmente prozessiert (Moese *et al.*, 2001; Odenbreit *et al.*, 2001). Beide Fragmente konnten in Bakterien auch ohne Wirtszellkontakt nachgewiesen werden, was darauf schließen ließ, dass es sich bei der dafür verantwortlichen Protease um ein bakterielles Enzym han-

deln muss. Nach der Infektion von Wirtszellen konnte die Prozessierung bisher jedoch nur in phagozytischen Zellen beobachtet werden was wiederum zu der Annahme führte, dass es sich hierbei eher um einen zelllinientypischen Prozess handelt (Moese *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte die Fragmentierung von CagA in der vorliegenden Arbeit sowohl in den phagozytischen Zelllinien THP1 und J774.A als auch in der humanen Magenepithelzelllinie MKN-45 detektiert werden. Bei der Infektion aller anderen untersuchten Zellen konnte dahingegen keine Prozessierung von CagA nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass das Protein nicht wirtszellunabhängig bereits in den Bakterien prozessiert wird. Man kann auch ausschließen, dass Bakterien hier aufgrund unterschiedlicher bakterieller Fitness keine CagA Prozessierung zeigten, da alle getesteten Zelllinien mit dem gleichen bakteriellen Ansatz infiziert wurden. Demzufolge scheinen spezifische Wirtszellfaktoren die Fragmentierung hier nicht nur zu verstärken, sondern sogar zu induzieren (**Abb. 3.7B**). Bisher ist noch nicht bekannt, welche Funktion die Prozessierung von CagA hat. Da dieser Effekt jedoch hier auch in einer Epithelzelllinie beobachtet werden konnte, scheint sich die Funktion nicht nur auf phagozytische Zellen zu beschränken. Durch den Einsatz spezifischer Protease-Inhibitoren in Kombination mit N-terminalen Sequenzierungsversuchen zur Identifikation der Schnittstellen, könnte die verantwortliche Protease identifiziert werden. Damit könnten evtl. neue Funktionen von CagA, die sich eventuell auf das Prozessieren des Effektors stützen, entdeckt und aufgeklärt werden.

3.6.3. Die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen

Bei der Analyse der CagA abhängigen Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen stellte sich heraus, dass es sich bei dem Effekt tatsächlich um einen Phänotyp zu handeln scheint, der nur in humanen Zelllinien vorkommt (**siehe Tab. 1**). Die Beschränkung dieses Phänotyps, könnte damit zusammenhängen, dass der Mensch der natürliche Wirt von *H. pylori* ist und die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen, Prozesse initiiert, die für eine langjährige Kolonisierung essentiell sind. Diese Theorie wird durch eine Studie unterstützt, die zeigt, dass eines der dephosphorylierten Proteine Ezrin ist (Selbach *et al.*, 2004). Ezrin wird durch einen VacA abhängigen Prozess proteolytisch gespalten, was zu einer Inhibierung der Säuresekretion von Parietal-Zellen führt und so die Kolonisierung von *H. pylori* im menschlichen Magen erleichtert (Wang *et al.*, 2008). Die Dephosphorylierung von Ezrin könnte ähnlich vorteilhafte Funktionen für das Bakterium haben. Bei Untersuchungen von gastrischen Biopsien *H. pylori* infizierter Patienten konnte z.B. beobachtet werden, dass adhärierende Bakterien häufig mit Microvilli assoziiert sind (Heczko *et al.*, 2000; Hemalatha *et al.*, 1991). 48 h nach der Infektion verringert sich die Menge an Microvilli drastisch (el Shoura *et al.*, 1995). Man nimmt an, dass das Bakterium durch die Zerstörung der Microvilli in noch engeren Kontakt mit der Wirtszellmembran kommt und so seine Adhäsion stabilisiert (el Shoura *et al.*, 1995). Interessanterweise ist Ezrin eine Schlüsselkomponente von Microvilli und eine De-

phosphorylierung des Proteins führt nachweislich zu einer Zerstörung dieser Membranfortsätze (Chen *et al.*, 1995). So könnte die Dephosphorylierung von humanen Wirtszellproteinen dem Bakterium tatsächlich einen Kolonisierungsvorteil bieten.

Um die Funktion der dephosphorylierten Proteine aus dieser Studie näher analysieren zu können, müssten diese Proteine jedoch zunächst in jeder Zelllinie identifiziert werden. Dies könnte beispielsweise durch quantitative Massen-Spektrometrie angereicherter Phosphoproteine von infizierten und nicht infizierten Zellen mittels SILAC realisiert werden (Ong *et al.*, 2002). Kolonisierungsstudien in Mäusen, die eines dieser Proteine nicht mehr exprimieren, könnten weitere Einblicke in die Rolle dieses T4SS induzierten Prozesses geben.

3.6.4. T4SS induzierte morphologische Veränderungen-eher die Ausnahme als die Regel

Eine weitere interessante Beobachtung konnte bei der Analyse *H. pylori* induzierter morphologischer Veränderungen gemacht werden (Abb. 3.7C). Hier zeigte nur die humane gastrische Epithelzelllinie AGS den sogenannten elongierten *hummingbird* Phänotyp. Molekulare Details, die diesem Phänotyp zugrunde liegen, konnten vor kurzem aufgeklärt werden (Higashi *et al.*, 2002;Tsutsumi *et al.*, 2003). So bindet CagA beispielsweise die Tyrosin-Phosphatase SHP-2 und aktiviert diese. SHP-2 spielt eine Schlüsselrolle in der HGF induzierten Veränderung der Zellmorphologie, die der des *hummingbird* Phänotyps sehr ähnelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphatase auch die *H. pylori* induzierte Zellelongation vermittelt (Higashi *et al.*, 2004). Da der Phänotyp im Gegensatz zur CagA-Translokation jedoch nur in einer Zelllinie detektiert werden konnte, SHP-2 aber ubiquitär exprimiert wird, scheint die Phosphatase nicht der einzige Wirtzellfaktor zu sein, der diesen Phänotyp steuert (Nagai und Roy, 2003;Neel *et al.*, 2003;Thomas und Brugge, 1997).

Bisher wurde angenommen, dass auch die Dephosphorylierung der Aktin-bindenden Proteine Ezrin, Vinculin und Cortactin zu der starken zellulären Elongation beitragen (Moese *et al.*, 2007;Selbach *et al.*, 2003;Selbach *et al.*, 2004). Da die Dephosphorylierung aber im Gegensatz zum *hummingbird* Phänotyp in mehreren Zelllinien auftrat, kann auch dieser Effekt nicht der einzige Induktor für die morphologische Veränderung sein.

Ein wirtszellspezifischer Schlüsselfaktor für diesen Phänotyp könnte der HGF-Rezeptor c-Met sein. Hier konnte gezeigt werden, dass CagA sowohl c-Met als auch das c-Met assoziierte Protein Grb2 bindet. Dies führt zu einer Aktivierung der HGF-vermittelten Signaltransduktion und so zu einer Formierung des sogenannten „Vereinzelung“-Phänotyps (*scattering phenotype*), der dem *hummingbird* Phänotyp sehr ähnelt (Churin *et al.*, 2003;Mimuro *et al.*, 2002). Die Ergebnisse dieser Studien basieren jedoch nur auf der Analyse von AGS-Zellen und wurden noch nicht für andere Zelllinien gezeigt. Durch eine detaillierte Untersuchung der c-Met Signaltransduktionskaskade in anderen Zelllinien, könnte analysiert werden, ob c-Met tatsächlich der Schlüsselfaktor für die T4SS abhängige Formierung dieses Phänotyps ist. Infektionen von mit siRNA behandelten Zellen, in denen die Proteinexpression von c-Met

unterdrückt ist, könnten ebenfalls Hinweise darauf liefern, ob c-Met tatsächlich der Schlüsselfaktor für dieses Phänomen ist.

Eine weitere *H. pylori* induzierte morphologische Veränderung zeigte sich in der homotypischen Aggregation der humanen Makrophagen-Zelllinie THP1. Die Beobachtung, dass dieser Phänotyp nicht bei anderen Zellen auftritt, lässt sich damit erklären, dass die daran beteiligten Moleküle nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. *H. pylori* erhöht T4SS abhängig die Expression von ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule 1*), das nur auf vaskulärem Endothel und von Makrophagen und Lymphozyten exprimiert wird (Moese *et al.*, 2002). ICAM-1 wiederum bindet an den Rezeptor LFA-1 (*lymphocyte function-associated protein 1*), der nur in Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen und Neutrophilen exprimiert wird. Durch die verstärkte Expression von ICAM-1 und die dadurch erhöhte Bindung von ICAM-1 an LFA-1 wird schließlich die homotypische Aggregation hervorgerufen. Angenommen wurde hier, dass der Phänotyp eng mit der proinflammatorischen Rekrutierung phagozytischer Zellen im Zusammenhang steht. Die genaue Funktion der starken Überexposition von ICAM-1 auf der Oberfläche infizierter Zellen ist jedoch noch nicht geklärt.

3.6.5. Das T4SS und die proinflammatorische Reaktion des Wirts

Die proinflammatorische Reaktion von *H. pylori* infizierten Zellen wird angeblich durch die T4SS vermittelte Translokation von Peptidoglycan eingeleitet (Viala *et al.*, 2004). Die dadurch induzierte Signaltransduktion aktiviert die eukaryotischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und führt so zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Chemokine wie IL-8 (**Abb. 3.7D**). Entsprechend dieser Ergebnisse konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass alle getesteten humanen Zelllinien eine starke T4SS abhängige IL-8-Sekretion zeigten. Zusätzlich konnte bei den beiden humanen Zelllinien HeLa und THP1 auch eine T4SS unabhängige IL-8-Sekretion nach *H. pylori* Infektion beobachtet werden. Dies könnte darauf basieren, dass die Zellen unabhängig von der Translokation des Effektors Peptidoglycan die Bakterien auf der Oberfläche durch spezifische Wirtszellrezeptoren wahrnehmen. Ein hierfür in Frage kommender bakterieller Faktor, der über solche Rezeptoren erkannt werden könnte, wäre beispielsweise das immunodominante, bakterielle Antigen HSP60, das dafür bekannt ist, eine T4SS unabhängige IL-8-Sekretion hervorzurufen (Yamaguchi *et al.*, 1999). Auf Wirtszellseite könnten hier wiederum Toll-like Rezeptoren (TLRs) eine wichtige Rolle spielen, da gezeigt werden konnte, dass TLR2 HSP60 detektiert und die angeborene Immunantwort aktiviert (Mandell *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der Analyse morphologischer Veränderungen zeigten alle humanen Zelllinien, die eine CagA Translokation vermitteln können, auch eine Sekretion von IL-8 (**siehe Tab. 1**). Folglich ist die proinflammatorische Signalkaskade in allen Zelltypen aktivierbar, in die das Bakterium CagA geschleust werden. Bemerkenswerterweise konnte in der humanen Zelllinie GLC4 jedoch weder eine Translokation von CagA noch eine

Sekretion von IL-8 detektiert werden, was die Hypothese unterstützt, dass CagA in die Sekretion von IL-8 involviert ist (Brandt *et al.*, 2005).

Bei der Infektion muriner Zellen zeigte sich ein anderes Ergebnis. Hier führte die Infektion der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774.A zu einer starken T4SS unabhängigen Sekretion des IL-8-Homologs Mip-2. Alle anderen untersuchten Mauszelllinien zeigten keine Mip-2 Sekretion. Diese Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass *H. pylori* Mäuse nur sehr schlecht infiziert (Cantorna und Balish, 1990). Außerdem haben Untersuchungen mit Maus-adaptierten *H. pylori* Stämmen gezeigt, dass es zwar zu proinflammatorischen Reaktionen kommt, diese aber T4SS unabhängig sind (Ferrero *et al.*, 2008). Den Ergebnissen zur Folge scheinen J774.A Zellen einen oder mehrere wirtszellspezifische Faktoren zu exprimieren, die die Infektion muriner Zellen mit *H. pylori* erleichtern. Ob sich diese Faktoren auf phagozytische Zellen beschränken, müsste durch die Untersuchung anderer muriner Makrophagen-Zelllinien geklärt werden. Da *H. pylori* induzierte proinflammatorische Reaktionen in Mäusen T4SS unabhängig verlaufen und Typ I Stämme in Mäusen schlecht oder gar nicht kolonisieren, stellt sich die Frage, ob das Mausmodell für proinflammatorische Untersuchungen mit medizinischem Hintergrund überhaupt geeignet ist, oder ob man auf das Gerbil-Modell ausweichen sollte. Bei Gerbilen ruft eine *H. pylori* Infektion eine ähnliche Pathogenese wie im Menschen hervor, da sie u.a. eine T4SS abhängige Gastritis zeigen (Hirayama *et al.*, 1996; Philpott *et al.*, 2002; Yokota *et al.*, 1991).

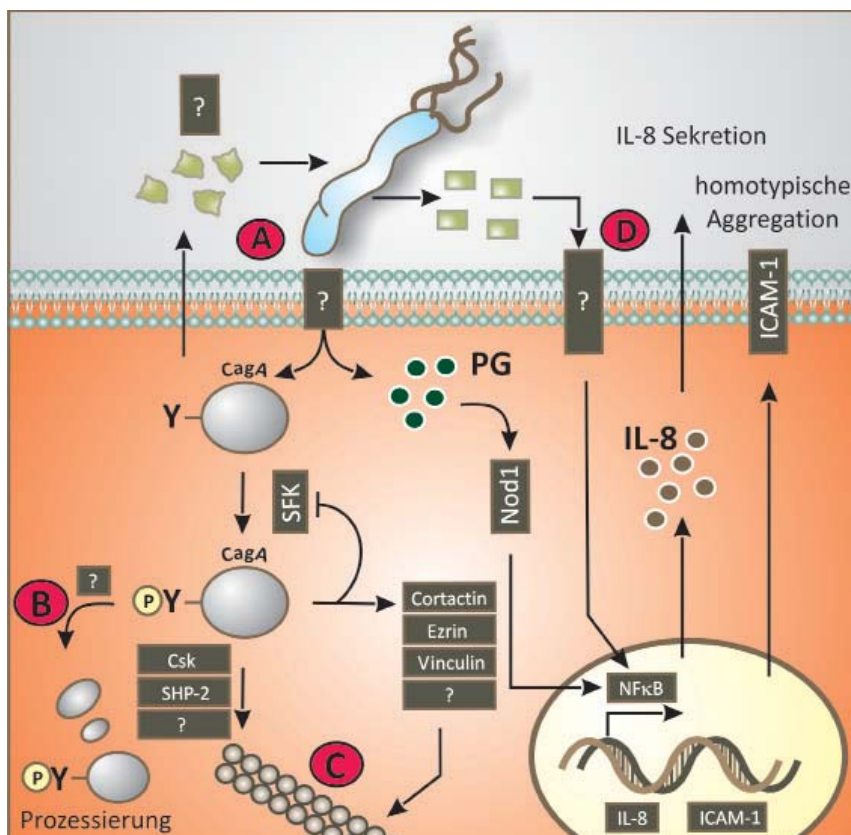


Abb. 3.7: Modell für die Rolle zellulärer Faktoren bei T4SS vermittelten, zellulären Wirtszellantworten.

H. pylori transloziert die Effektoren CagA und Peptidoglycan (PG) in die Wirtszelle. Dort wird CagA durch Src-Kinasen und c-Abl phosphoryliert. Tyrosin-phosphoryliertes CagA interagiert u.a. mit Csk und SHP-2 wodurch die Src-Kinase inaktiviert wird. Dadurch werden Src-Substrate wie Cortactin, Vinculin und Ezrin dephosphoryliert, was zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und zu einer Induktion des *hummingbird* Phänotyps führt. Peptidoglycan wird über den intrazellulären Rezeptor Nod1 erkannt und aktiviert den Transkriptionsfaktor NF-κB. Diese Aktivierung induziert die Sekretion von IL-8 und die Exposition von ICAM-1 auf der zellulären Oberfläche. (A) Wirtszellfaktoren scheinen so-

wohl eine Rolle in der CagA- als auch Peptidoglycan-Translokation zu spielen. (B) Auch die Ergebnisse der Prozessierung von CagA weisen darauf hin, dass hier spezielle Wirtszell-Proteasen eine Rolle spielen. (C) Der *hummingbird* Phänotyp kann nur in AGS-Zellen beobachtet werden. Demzufolge sind wahrscheinlich bisher unbekannte Wirtszellfaktoren an diesem Prozess beteiligt (D) HeLa- und THP1-Zellen sekretieren IL-8 auch durch einen T4SS unabhängigen Mechanismus. Dies lässt vermuten, dass es auch andere extra- und intrazelluläre Rezeptoren gibt, die diese Wirtszellantwort steuern.

Die *H. pylori* induzierte Pathogenese im Menschen basiert vor allem auf einer chronischen Gastritis, die durch T4SS vermittelte, proinflammatorische Reaktionen ausgelöst wird. Da diese T4SS abhängigen Signaltransduktionswege in Mäusen anscheinend nicht benötigt werden, besteht das Risiko der Fehlinterpretation von Daten. Bei Maus-Studien sollte deshalb immer die Möglichkeit miteinbezogen werden, dass das T4SS in Mäusen für diese prominente Wirtszellantwort keine Rolle spielt und demzufolge hier andere Signaltransduktionswege die proinflammatorische Reaktion auslösen.

3.6.6. Schlusswort

Die vorliegende Analyse T4SS abhängiger Wirtszellantworten von Zelllinien verschiedenen Ursprungs demonstriert klar, wie wichtig wirtszellspezifische Komponenten innerhalb des Infektionsprozesses sind und zu welchen Infektionszeitpunkten sie ihren Einfluss nehmen. Anhand der Daten konnte ein Modell entwickelt werden, das nicht nur darauf hinweist, welche T4SS abhängigen Prozesse durch Wirtszelldeterminanten beeinflusst werden, sondern auch in welchem Zusammenhang sie zueinander stehen (**Abb. 3.7**). Die Identifikation dieser Wirtszellfaktoren könnte neues Licht auf die molekularen Details der Wirt-Pathogen Interaktion werfen, mit dessen Hilfe neue Strategien in der zielgerichteten therapeutischen Behandlung von *H. pylori* Infektionen entwickelt werden könnten. Mit einer gezielten Hemmung dieser Faktoren würde die *H. pylori* induzierte Pathogenese entscheidend beeinflusst werden, da so selektiv T4SS spezifische Wirtszellreaktionen abgeschwächt oder sogar verhindert werden könnten.

4. *H. pylori* manipuliert selektiv die Endozytose und die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch eine CagA abhängige Aktivierung von c-Abl und SHP-2

Während es bei den meisten *H. pylori* infizierten Menschen nach einer langjährigen Kolonisierung des Magens zu histologisch nachweisbaren Entzündungen kommt, entwickeln 10-20% ernsthafte Erkrankungen wie Magengeschwüre oder Magenkrebs (Nguyen *et al.*, 1999). Diese Erkrankungen sind wiederum eng mit der Infektion von *H. pylori* Typ I Stämmen assoziiert, die mit einer erhöhten Pathogenität in Verbindung gebracht werden, da sie wichtige Virulenzfaktoren wie das T4SS, CagA und VacA exprimieren.

Transloziertes CagA wird in der Wirtszelle durch aktivierte Src Kinasen an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert (Stein *et al.*, 2000). Einige Stunden nach der Infektion kommt es durch eine negative Rückkopplungsschleife zu einer CagA abhängigen Inaktivierung von Src-Kinasen. Die anhaltende Phosphorylierung von CagA wird dann von der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl vermittelt (Poppe *et al.*, 2007; Selbach *et al.*, 2002a; Selbach *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007).

Die ubiquitär exprimierte Tyrosinkinase c-Abl ist ein multifunktionales Enzym, das ursprünglich als das eukaryotische Homolog von v-Abl, dem transformierenden Gen des *Abelson murine leukemia virus*, identifiziert wurde (Rosenberg und Witte, 1988). Es steuert wichtige zelluläre Prozesse wie Aktin-Organisation, Zellmigration, Zellwachstum, Zellüberleben und zelluläre Antworten auf DNA-Schädigung. Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen ist die Kinase in verschiedenen subzellulären Kompartimenten wie Nukleus, Mitochondrien und Zytoplasma lokalisiert (Hantschel und Superti-Furga, 2004).

Neben v-Abl und c-Abl existiert noch eine dritte Abl-Form, das Fusionsprotein Bcr-Abl, das durch die T(9;22)-Philadelphia-Chromosomentranslokation entsteht. Dieses Enzym besitzt eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität und induziert eine verstärkte Aktivierung c-Abl abhängiger Signalkaskaden, die zu der Expression von Genen führen, die entscheidend an der Ausbildung der Chronischen Myelogenen Leukämie (CML) beteiligt sind (Deininger *et al.*, 2000).

Die Domänen von c-Abl ähneln in ihrer Anordnung sehr denen von Src-Kinasen (Abb. 4.1.). Die Kinase besitzt eine Tyrosinkinase-, eine Src-homology-2 (SH2)- und eine SH3-Domäne (Hantschel und Superti-Furga, 2004). Hinzu kommt eine lange C-terminale, Prolin-reiche Region mit vielen Protein-Protein Interaktionsstellen, die für die verstreute zelluläre Lokalisation von c-Abl verantwortlich ist. Durch die Interaktionen mit Proteinen wie dem Adapterprotein Crk, dem Zytoskelett-bindenden Protein Vinexin und der Kinase Pak2 steuert c-Abl die Funktion des Aktin-Zytoskeletts und ist so stark in die Regulierung von Zellmotilität involviert (Kain und Klemke, 2001; Machuy *et al.*, 2007; Mitsushima *et al.*, 2006).

Während der Infektion mit *H. pylori* kommt es zu einer Komplexbildung von c-Abl und CagA, die zu einer Aktivierung von c-Abl führt (Tammer *et al.*, 2007). Zusammen mit der Inaktivierung von Src, die zu der Dephosphorylierung von Aktin-bindenden Proteinen wie Cortac-

tin führt, induziert c-Abl so eine CagA abhängige Erhöhung der Zellmotilität (Poppe *et al.*, 2007;Selbach *et al.*, 2003;Tammer *et al.*, 2007). Bisher ist unbekannt, ob c-Abl in der *H. pylori* Infektion, neben der Phosphorylierung von CagA und der Erhöhung der Zellmotilität noch weitere Funktionen übernimmt.



Abb. 4.1: Protein-Domänen der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl.

Die Kinase besitzt eine N-terminale SH3- und SH2- Domäne für die Interaktion mit Prolin-reichen Sequenzen (über SH3) bzw. Tyrosin-phosphorylierten Proteinen (über SH2). Darauf folgt eine SH1 Tyrosinkinase-Domäne (TK) und eine nukleare Transport-Sequenz (NLS), die von mehreren Prolin-reichen (P) Motiven flankiert ist. C-Abl besitzt ebenfalls DNA-bindende Motive (DNA) und ein C-terminales Aktin-bindendes Motiv (Aktin BD).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch der EGF-Rezeptor mit c-Abl interagiert. Nach Liganden-Bindung bindet und aktiviert diese Rezeptor-Tyrosinkinase c-Abl, woraufhin c-Abl die Endozytose des EGF-Rezeptors durch eine Phosphorylierung der EGF-Rezeptor Tyrosinstelle Y1173 inhibiert (Jones *et al.*, 2006;Plattner *et al.*, 1999;Tanos und Pendergast, 2006;Zhu *et al.*, 1993). Zusätzlich blockiert die Aktivierung von c-Abl die Rekrutierung der Ubiquitin Ligase Cbl zu dem aktivierten EGF-Rezeptor, und verhindert so seine Cbl abhängige Degradierung. Diese wird normalerweise durch eine Cbl vermittelte Ubiquitinylierung eingeleitet. Da sowohl die Rezeptor-Endozytose als auch die Rezeptor-Degradierung wichtige Prozesse sind, die zu einer Termination der Signaltransduktion führen, nimmt c-Abl demzufolge in der Regulation der Signalübertragung eine Schlüsselrolle ein.

Der EGF-Rezeptor kontrolliert wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose. Aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums können bereits kleine Störungen dieser Signalkaskaden erhebliche Auswirkungen auf die betroffenen Zellen haben. Mutationen des EGF-Rezeptors, die zu einer verstärkten Signalvermittlung führen (Abb. 4.2), enden oft in unkontrolliertem Zellwachstum und fördern auf diesem Weg die Entstehung und Ausbreitung von Tumoren (Moscattello *et al.*, 1995;Wong *et al.*, 1992).

Wird der EGF-Rezeptor Signalweg dahingegen im Magen gehemmt (Abb. 4.2), kann der Wachstumsfaktor und EGF-Rezeptor Ligand EGF (*epidermal growth factor*; epidermaler Wachstumsfaktor) den EGF-Rezeptor Signalweg nicht mehr aktivieren. Dies führt dazu, dass bei Verletzungen des Magenepithels weder der Gehalt an Säure reduziert, noch verletztes Epithelgewebe regeneriert werden kann (Shaw *et al.*, 1987;Tarnawski und Jones, 1998). Dies kann zur Entstehung von Magengeschwüren führen, da eine gezielte Gewebserneuerung durch EGF induzierte Proliferation nicht mehr möglich ist.

Die Regulation der EGF-Rezeptor induzierten Signalkaskade unterliegt fein regulierten Mechanismen, die sowohl auf die Dimerisierung des EGF-Rezeptors mit unterschiedlichen Rezeptoren der ErbB-Familie (ErbB2, ErbB3, ErbB4) als auch auf endozytotische Mechanismen zurückgeführt werden können. Letztere schleusen die aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase in den lysosomalen Abbauweg und führen so eine Termination der Signalkaskade herbei (Dikic und Giordano, 2003;Grandal und Madshus, 2008;Roepstorff *et al.*, 2008;Yarden und Sliv-

kowski, 2001). Neueste Studien mit Phosphotyrosinphosphatasen (PTPs) weisen darauf hin, dass die Dephosphorylierung von Tyrosinresten des EGF-Rezeptors genauso wichtig für die Regulation des Rezeptors ist wie dessen Phosphorylierung. Diese Protein-Modifikation kann die Signalkaskade verstärken. Die ubiquitär exprimierte zytoplasmatische Phosphatase SH2 Phosphatase 2 (SHP-2) ist einer der bekanntesten Aktivatoren der EGF-Rezeptor Signaltransduktion (Neel *et al.*, 2003; Neel und Tonks, 1997). Sie ist die erste Phosphatase, für die beschrieben wurde, dass sie auch als humanes Onkoprotein fungieren kann, da Mutationen von SHP-2 zu genetischen Krankheiten (Noonan Syndrom) und Leukämien führen können (Tartaglia *et al.*, 2001).

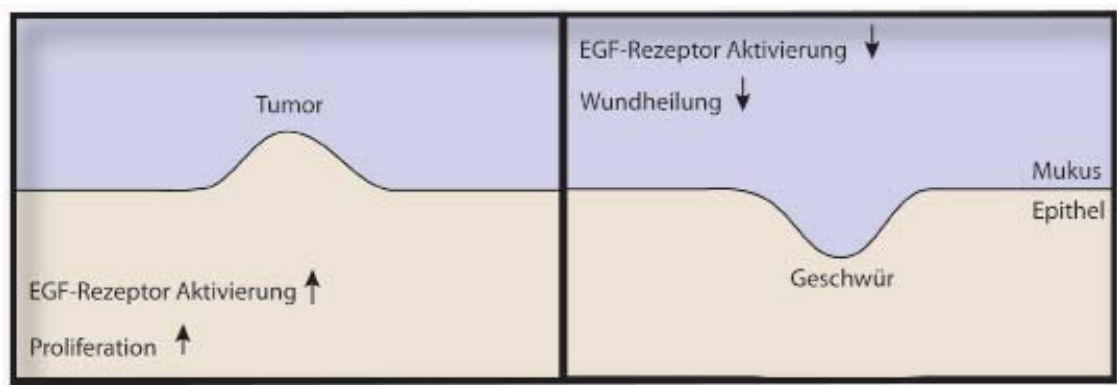


Abb. 4.2: Modell der EGF-Rezeptor induzierten Geschwür- und Tumor-Bildung.

Bei einer verstärkten EGF-Rezeptor Signalkaskade proliferieren die Zellen unkontrolliert und es kann zu der Entstehung von Tumoren kommen. Ist die EGF-Rezeptor Signaltransduktion jedoch inhibiert, wird die Wundheilung (Reepithelialisierung) des Gewebes bei Verletzungen blockiert und es besteht das Risiko der Geschwürbildung.

Interessanterweise spielt SHP-2 auch in *Helicobacter* Infektionen eine große Rolle (Hatakeyama, 2004). Die Interaktion mit dem phosphoryliertem Effektor CagA stimuliert die Phosphatase-Aktivität von SHP-2 und führt so zu der Induktion einer Zellantwort, die sich in der elongierten Zellform infizierter Epithelzellen (*hummingbird phenotype*) äußert. Sie wird durch eine SHP-2 vermittelte Inhibierung der FAK (*focal adhesion kinase*) und einer Ras-unabhängigen Aktivierung von ERK1/2 hervorgerufen (Higashi *et al.*, 2004; Tsutsumi *et al.*, 2006).

H. pylori Infektionen können den EGF-Rezeptor auch direkt beeinflussen. Die meisten *in vitro* Studien, die den Einfluss von *H. pylori* auf die EGF-Rezeptor Signaltransduktion untersucht haben, fokussierten sich hierbei auf frühe Wirtszellantworten innerhalb der ersten drei Stunden nach der Infektion. Hier wurde sowohl eine Aktivierung des EGF-Rezeptors beobachtet als auch eine erhöhte Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase festgestellt, die zu einer verstärkten Expression EGF-Rezeptor abhängiger Gene führt (Ashktorab *et al.*, 2007; Keates *et al.*, 2005; Wallasch *et al.*, 2002). Dies führte zu der Annahme, dass der EGF-Rezeptor stark in die *H. pylori* induzierte Tumorentstehung involviert ist. Ob diese Veränderungen jedoch auch nach längeren Infektionsperioden zu finden sind wurde bisher noch nicht untersucht. Da jahrelange, chronische Infektionen der humanen gastrischen Mukosa, aber eine Voraussetzung für die Entwicklung ernsthafter Krankheiten sind, und Fehlfunktionen der EGF-Rezeptor Signalkaskade eng mit der Entstehung von Krebs und Magengeschwüren assoziiert sind, ist eine

Analyse der EGF-Rezeptor Aktivierung und -Signaltransduktion zu späteren Zeitpunkten der Infektion sehr wichtig. Außerdem ist noch nicht vollständig geklärt, ob die kurz nach der Infektion beobachtete Verstärkung der EGF-Rezeptor Expression der Hauptgrund für eine beobachtete Erhöhung der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition auf infizierten Zellen ist (Keates *et al.*, 2007).

Da eine erhöhte Rezeptorpopulation auf der Zelloberfläche häufig zu Veränderungen der jeweiligen Signalkaskade führt, sollte dieser Aspekt in diesem Abschnitt der Arbeit eingehend untersucht werden. Hierbei sollte der Einfluss von längeren Infektionsperioden (20 – 24 h nach Infektion) auf die EGF-Rezeptor Oberflächenexposition und die EGF-Rezeptor Signaltransduktion genauer analysiert werden. Der Infektionszeitpunkt von 20 h wurde deshalb ausgewählt, da hier der *hummingbird* Phänotyp im Gegensatz zu frühen Infektionszeitpunkten in jeder Zelle induziert ist und sich die Infektion vollständig etabliert hat. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Zellen hier noch nicht durch Apoptose absterben, und deshalb für *in vitro* Analysen verwendet werden können. Die Untersuchung der Auswirkungen von *H. pylori* Infektionen auf den EGF-Rezeptor zu späteren Zeitpunkten der Infektion soll klären, ob der EGF-Rezeptor tatsächlich einer der Hauptmediatoren der Krebsentstehung in infizierten Patienten ist, oder nicht.

4.1. *H. pylori* blockiert die Endozytose des EGF-Rezeptors durch die CagA abhängige Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl

4.1.1. Der *H. pylori* Effektor CagA erhöht die EGF-Rezeptor Oberflächenexposition auf gastrischen Epithelzellen nach verlängerter Infektionsdauer

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Infektionen mit *H. pylori* nach einer Stunde die EGF-Rezeptor Expression erhöhen. Deshalb sollte hier zunächst untersucht werden, ob sich auch die Rezeptorpopulation auf der Oberfläche von infizierten Zellen verändert. Hierfür wurde eine längere Infektionszeit von 20 h gewählt, um Zustände untersuchen zu können, die nach vollständiger Etablierung der Infektion vorliegen.

Die Oberflächenexposition des EGF-Rezeptors wurde zuerst mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie analysiert (**Abb. 4.3A**). Hierfür wurden AGS Zellen mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 infiziert. Anschließend wurden die Zellen unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors gefärbt (grün).

Im Vergleich zu nicht infizierten Zellen zeigen *H. pylori* infizierte Zellen eine verstärkte Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors. Doppelfärbungen mit einem Antikörper gegen *H. pylori* (rot) demonstrieren, dass der beobachtete Anstieg EGF-Rezeptor spezifisch ist und nicht auf eine unspezifische Bindung von *H. pylori* an Antikörper zurückgeführt werden kann. Um

auszuschließen, dass die Antikörper auch intrazelluläre EGF-Rezeptormoleküle anfärben, wurde die EGF-Rezeptor Oberflächenfärbung mit konfokaler Mikroskopie genauer analysiert. Dadurch kann überprüft werden, ob die Erhöhung der Oberflächenexposition auf infizierten Zellen unabhängig von einer erhöhten Genexpression verläuft. Es konnte keine intrazelluläre Färbung des EGF-Rezeptors detektiert werden, was beweist, dass das verstärkte Fluoreszenzsignal des EGF-Rezeptors auf infizierten Zellen, tatsächlich auf eine verstärkte Oberflächenexposition zurückzuführen ist (**Abb. 4.3B**).

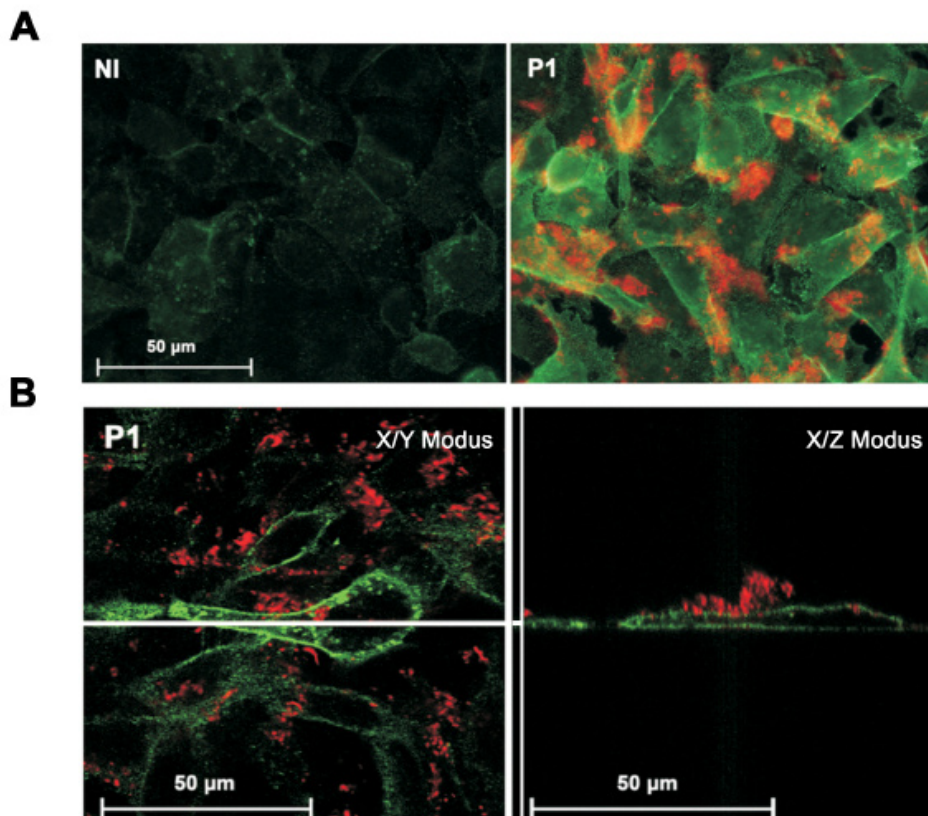


Abb. 4.3: Immunofluoreszenz-Analyse der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition auf *H. pylori* infizierten Zellen. AGS-Zellen wurden 20 h mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 (MOI 100) infiziert. Infizierte (P1) und nicht infizierte (NI) Zellen wurden unter nicht-permeabilisierten Bedingungen mit einem anti EGFR-Antikörper (grün) und einem anti *H. pylori*-Antikörper (rot) gefärbt. A) Analyse der Zellen mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop; 100 fache Vergrößerung. B) Analyse von infizierten Zellen mit einem konfokalen Mikroskop. Linker Bildabschnitt: Aufnahme im X/Y-Modus. Weiße Linie: Position der Z-Ebene in rechtem Bildabschnitt. Rechter Bildabschnitt: Aufnahme im X/Z-Modus.

Um die *H. pylori* vermittelte Erhöhung der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition mit einem weiteren experimentellen Ansatz zu bestätigen, wurden zusätzlich FACS-Experimente durchgeführt (**Abb. 4.4**). Durch Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen der eingesetzten Zellen konnte ausgeschlossen werden, dass intrazelluläre Färbungen des EGF-Rezeptors bei der sensitiven FACS-Messung additiv wirken (**Abb. 4.4B**). Für die Analyse wurden die Zellen unter Verwendung von unterschiedlichen MOIs infiziert, um die Effizienz des beobachteten Effekts untersuchen zu können. Die Zellverteilungsdichtediagramme (*Density Dot plots*; **Abb. 4.4A**), zeigen eine Verschiebung der infizierten Zellpopulation innerhalb des EGFR Cy2 Kanals (*Gate 2*) und deuten somit eine intensivierte Färbung des EGF-Rezeptors auf der Oberfläche infizierter Zellen an. Das Histogramm (**Abb. 4.4C**) und das Balkendiagramm (**Abb.**

4.4D) zeigen deutlich, dass Infektionen mit *H. pylori* eine zweifache Hochregulation der EGFR-Rezeptorpopulation auf der Wirtszell-Oberfläche induzieren. Der Effekt erscheint bereits unter Verwendung geringer MOIs. Demzufolge reicht schon eine kleine Menge von fünf Bakterien pro Zelle aus, um diesen Effekt zu induzieren.

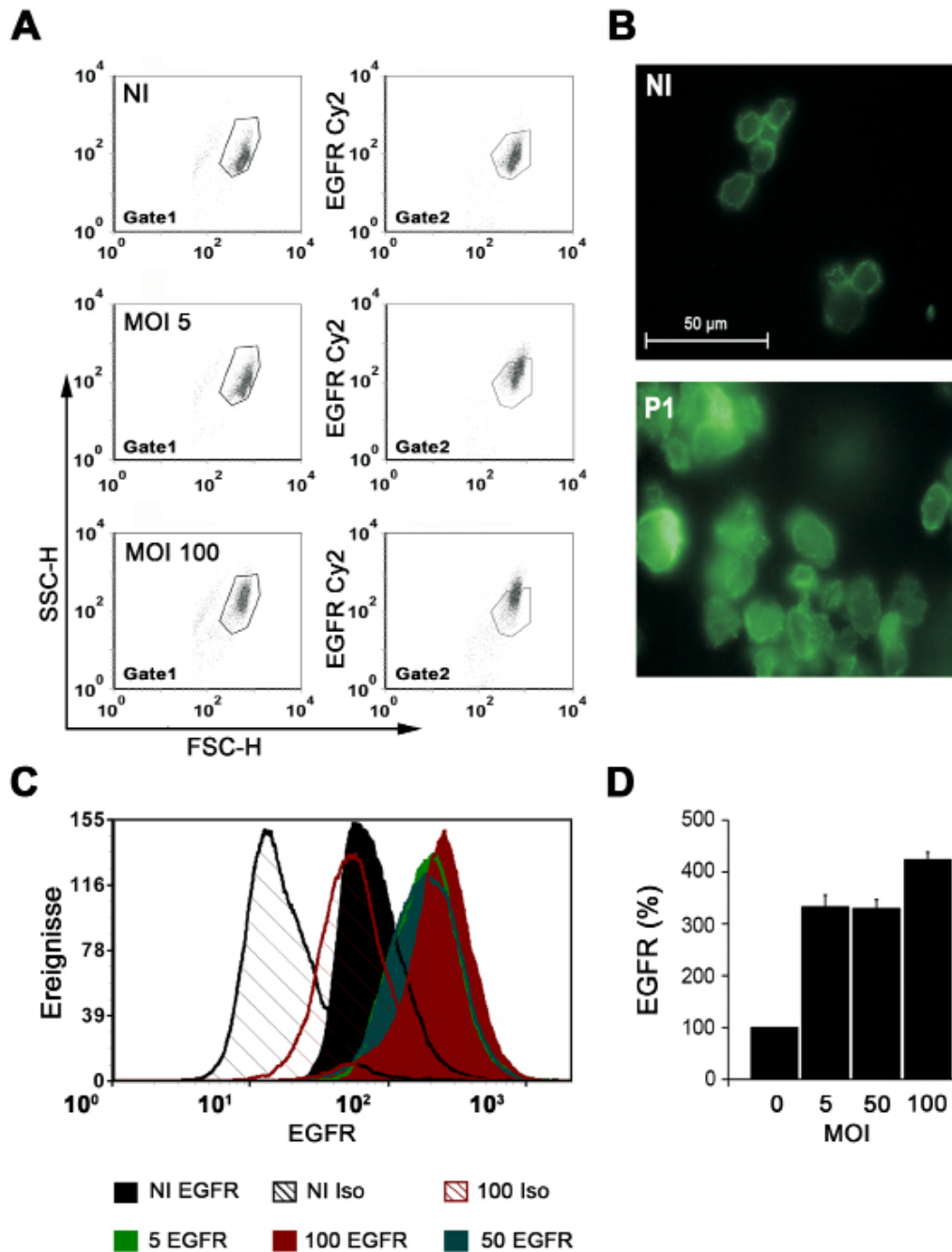


Abb. 4.4: FACS-Analyse der EGFR-Rezeptor Oberflächenexposition auf *H. pylori* infizierten Zellen unter Verwendung verschiedener MOIs.

AGS-Zellen wurden 20 h mit P1 (MOI 5, 50, 100) infiziert. Infizierte (P1) und nicht infizierte (NI oder MOI 0) Zellen wurden im nicht-permeabilisierten Zustand mit einem anti EGFR-Antikörper (EGFR-Cy2) oder der Isotypenkontrolle (Iso) gefärbt. A) Zellverteilungsdichtediagramme mit repräsentativen Zellpopulationen; Links: Zellgröße und Granularität der ausgewählten Population im SSC-H/FSC-H-Kanal (Gate1); Rechts: Fluoreszenzintensität der ausgewählten Population im EGFR Cy2/FSC-H-Kanal (Gate2). B) Mikroskopische Analyse der Zellen, die für die FACS-Analyse eingesetzt wurden (MOI 50). C) Histogramm mit Fluoreszenzintensitäten der Zellpopulationen von nicht infizierten (NI EGFR) und infizierten Zellen (5 EGFR; 50 EGFR; 100 EGFR), die mit dem anti EGFR-Antikörper oder mit der Isotypenkontrolle gefärbt wurden (NI Iso; 100 Iso). D) Diagramm mit prozentualer Rezeptormenge auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Da sowohl Veränderungen des EGF-Rezeptor Signalwegs als auch der bakterielle Effektor CagA eng mit der Entstehung von Krebs und Magengeschwüren assoziiert sind, sollte untersucht werden, ob die *H. pylori* induzierte Hochregulation des EGF-Rezeptors CagA abhängig ist (Hatakeyama, 2004; Yarden, 2001). Für die Analyse wurden AGS Zellen mit P1 oder der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA infiziert. 1,5 und 24 h nach der Infektion wurden die Zellen mit einem anti EGF-Rezeptor Antikörper gefärbt und mittels FACS-Analyse auf die EGF-Rezeptor Oberflächenexpression untersucht. Da nach 24 h Infektion die erhöhte EGF-Rezeptor Oberflächenexposition in Zellen, die mit der Deletionsmutante infiziert wurden, nicht auftritt (Abb. 4.5A&B), kann man schlussfolgern, dass *H. pylori* die erhöhte EGF-Rezeptor Oberflächenexposition in Abhängigkeit von CagA induziert. Zusätzlich zeigen die Daten, dass der Effekt nicht auf Zellen zu sehen ist, die nur 1,5 h infiziert wurden. Es handelt sich demnach tatsächlich um ein Phänomen das erst zu späteren Zeitpunkten der Infektion zu detektieren ist. Um nachzuweisen, dass die CagA abhängige Hochregulation nicht mit einer veränderten EGF-Rezeptor Expression in Verbindung steht, wurde die EGF-Rezeptor Proteinmenge 1,5 und 24 h nach der Infektion überprüft (Abb. 4.5C). Es konnten keine Veränderungen des EGF-Rezeptors auf Proteinebene detektiert werden. Dies unterstreicht, dass der CagA abhängige Effekt tatsächlich einem endozytotischen Mechanismus zugeordnet werden kann.

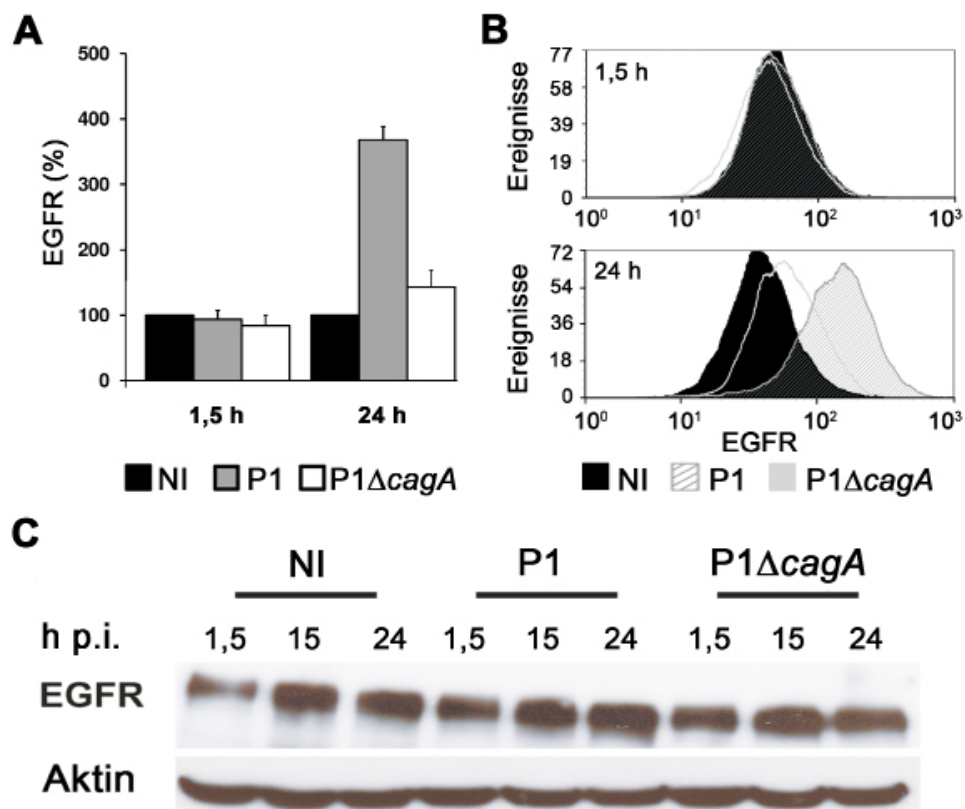


Abb. 4.5: Analyse der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition von P1 und P1 Δ cagA infizierten AGS-Zellen.

AGS-Zellen wurden 1,5 und 24 h mit P1 und der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA (MOI 100) infiziert. A-B) FACS-Analyse von infizierten und nicht infizierten (NI) Zellen. Die Zellen wurden mit dem anti EGFR-Antikörper oder der korrespondierenden Isotypenkontrolle gefärbt und analysiert. Links: Diagramm mit prozentualer EGFR-Oberflächenpopulation zu bestimmten Zeitpunkten der Infektion. Rechts: Histogramm mit Fluoreszenzintensitäten der EGFR-Oberflächenexposition auf analysierten Zellpopulationen. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. C) Immunoblotanalyse der EGFR-Expression. Die Zellen wurden mit einem polyklonalem anti EGFR-Antikörper analysiert. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti β -Aktin-Antikörper durchgeführt.

CagA interagiert mit einer bakteriellen DNA Gyrase (Pyndiah *et al.*, 2007). Demzufolge könnte eine Deletion des Gens Auswirkungen auf die bakterielle Genexpression haben. Das würde bedeuten, dass CagA-Mutanten eine schlechtere Fitness vorweisen und Infektionen ineffektiver sind als mit dem Wildtyp-Stamm. Da man so unter Nutzung der Mutanten immer eine CagA-Abhängigkeit in die Daten hinein interpretiert, würde dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Um dies auszuschließen, sollte die in **Abb. 4.5** beobachtete CagA Abhängigkeit nochmals mit einem anderen experimentellen Ansatz bestätigt werden, der ohne den Einsatz einer Mutante durchgeführt wird. So wurde CagA in AGS Zellen transient überexprimiert und die EGF-Rezeptor Oberflächenexposition anschließend mittels FACS-Analyse untersucht (**Abb. 4.6A**). In einem weiteren Ansatz wurde eine CagA-Mutante exprimiert, die Phosphorylierungs-resistent ist (Higashi *et al.*, 2002). Mit diesem Versuch sollte analysiert werden, ob der Effekt in Abhängigkeit des Phosphorylierungs-Status des Effektors auftritt (**Abb. 4.6B**). Da die beiden CagA-Proteine an Hämagglutinin (HA) konjugiert sind, konnte die Expression der Konstrukte mittels Immunoblotanalyse unter Verwendung einer anti HA-Antikörpers überprüft werden (**Abb. 4.6C**).

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass die Expression von CagA ausreichend ist, um die EGF-Rezeptor Oberflächenpopulation zu erhöhen. Außerdem wird deutlich, dass die Hochregulation unabhängig von der Phosphorylierung von CagA induziert wird, da Zellen, die die Phosphorylierungs-resistente CagA-Mutante exprimieren, ebenfalls eine Hochregulation der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition zeigen. Die Daten bestätigen nicht nur die Ergebnisse des Versuchs aus **Abb. 4.5**, sondern verweisen auch auf einen neuen CagA abhängigen Mechanismus, der auch ohne die Phosphorylierung des Effektors initiiert wird.

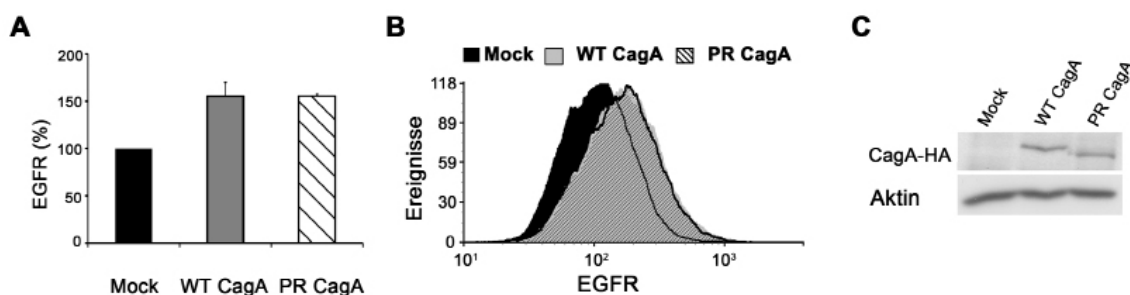


Abb. 4.6: Analyse der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition von CagA transfizierten AGS-Zellen.

AGS-Zellen wurden mit CagA (WT CagA) oder einer Phosphorylierungs-resistenten CagA Mutante (PR CagA) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen und die scheintransfizierte Mock-Kontrolle (Transfektion mit Reagenz aber ohne Plasmid-DNA) mit dem anti EGFR-Antikörper oder der korrespondierenden Isotypenkontrolle gefärbt und mittels FACS analysiert. A) Diagramm der prozentualen EGFR-Oberflächenpopulation. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. B) Histogramm mit Fluoreszenzintensitäten der EGFR-Oberflächenexposition auf analysierten Zellpopulationen. C) Immunoblotanalyse der CagA Expression. Die Zelllysate wurden mit einem monoklonalen anti HA-Antikörper analysiert. Die Ladekontrolle erfolgte unter Verwendung eines anti β -Aktin-Antikörpers.

Die Daten zeigen deutlich, dass verlängerte Infektionen mit *H. pylori* Typ I Stämmen zu einer starken Erhöhung der EGF-Rezeptorpopulation auf der Zelloberfläche führen und dass der bakterielle Effektor CagA den zu Grunde liegenden Mechanismus steuert. Darüber hin-

aus wird demonstriert, dass der Effekt unabhängig von der Phosphorylierung von CagA initiiert wird.

4.1.2. Die *H. pylori* induzierte Erhöhung der Rezeptor-Population auf der Wirtszelloberfläche richtet sich selektiv gegen den EGF-Rezeptor

Als nächstes sollte ermittelt werden, ob es sich bei der beobachteten Hochregulation um einen Rezeptor-spezifischen Vorgang handelt, oder ob auch andere Oberflächenmoleküle von diesem Effekt betroffen sind. Hierfür wurde die Oberflächen-Exposition der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met (*mesenchymal-epithelial transition factor*) untersucht, die dem EGF-Rezeptor sowohl in Funktion als auch in ihrem endozytotischen Aufnahmemechanismus ähnelt (Abb. 4.7A&C). Sie reguliert Prozesse wie Zellproliferation und Zellwachstum und wird nach der Bindung des Liganden HGF (*hepatocyte growth factor*) über die Aufnahme in Vesikel früher Endosomen (*early endosomes*) internalisiert (Hammond *et al.*, 2001). Auch in Infektionen mit *H. pylori* spielt der c-Met Rezeptor eine wichtige Rolle, indem er sowohl eine erhöhte Zellmotilität als auch eine erhöhte Zellinvasion vermittelt (Churin *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006). Um ebenfalls ein Oberflächenmolekül zu untersuchen, das sich vom EGF-Rezeptor sowohl in Funktion als auch in der Endozytose unterscheidet, wurde zusätzlich die Oberflächenpopulation von HLA-E Molekülen (*major histocompatibility complex (MHC) class-I molecule*) mittels FACS analysiert (Abb. 4.7B&C).

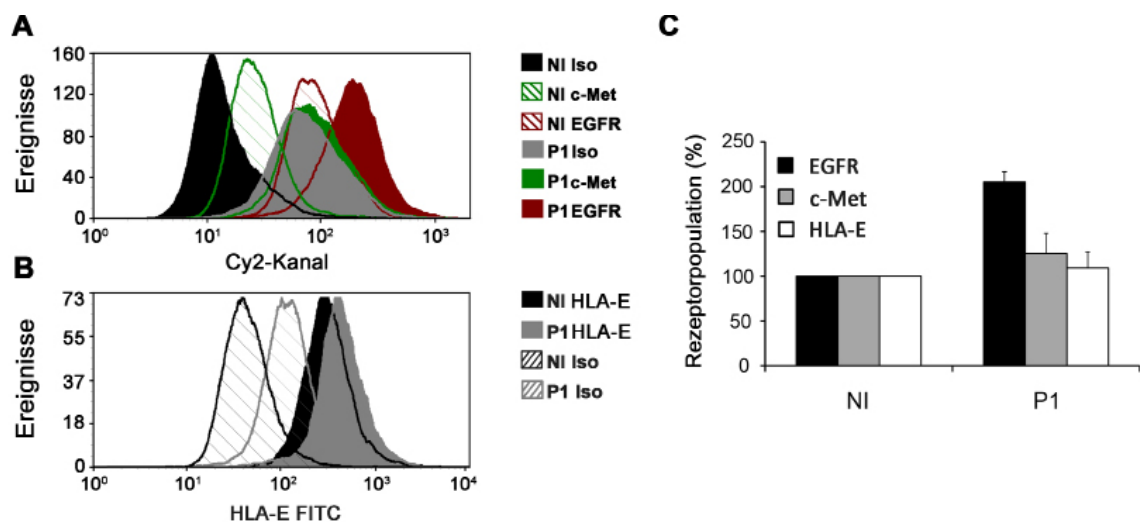


Abb. 4.7: FACS-Analyse der EGF-Rezeptor, c-Met und HLA-E Oberflächenexposition auf *H. pylori* infizierten Zellen. AGS-Zellen wurden 20 h mit P1 infiziert (MOI 100). Infizierte (P1) und nicht infizierte (NI) Zellen wurden im nicht-permeabilisierten Zustand mit dem anti EGFR-Antikörper (EGFR), einem anti c-Met-Antikörper (c-Met), einem HLA-E FITC konjugierten Antikörper (HLA-E) oder der entsprechenden Isotypenkontrolle (Iso) gefärbt. A) Histogramm mit Fluoreszenzintensitäten der Zellpopulationen nach der Färbung von c-Met, EGFR und der korrespondierenden Isotypenkontrolle. B) Histogramm mit Fluoreszenzintensitäten der Zellpopulationen von HLA-E Molekülen und der korrespondierenden Isotypenkontrolle. C) Diagramm mit prozentualer Rezeptormenge von c-Met, EGFR und HLA-E Molekülen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unterschiedlichen Experimenten ermittelt.

HLA-E Moleküle sind auf fast jedem Zelltyp lokalisiert, wo sie eine wichtige Rolle in der Präsentation von Antigenen spielen. Außerdem schützen sie die Zellen vor Angriffen natürlicher

Killerzellen (Flutter und Gao, 2004). Im Gegensatz zum EGF-Rezeptor und c-Met verläuft die Internalisierung von HLA-E Molekülen unabhängig von Clathrin und Dynamin, zwei Aktin-assoziierten Proteinen, die in vielen endozytotischen Prozessen aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinasen involviert sind.

Für die vergleichende Analyse wurden sowohl der EGF-Rezeptor als auch c-Met und HLA-E Moleküle auf der Oberfläche infizierter und nicht infizierter Zellen gefärbt und mittels FACS untersucht. Interessanterweise änderte sich hierbei die Oberflächenpopulation von c-Met und HLA-E Molekülen auf *H. pylori* infizierten Zellen nicht, während die Oberflächenpopulation des EGF-Rezeptors stark hochreguliert wird. Da weder c-Met noch HLA-E Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen reguliert werden, sprechen die Daten für einen spezifischen Effekt, der sich ausschließlich gegen den EGF-Rezeptor richtet.

4.1.3. Die erhöhte EGF-Rezeptor Oberflächenexposition auf *H. pylori* infizierten Zellen basiert auf einer Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose

Mit den vorhergehenden Versuchen konnte bereits ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Oberflächenexposition des EGF-Rezeptors bei infizierten Zellen auf eine Erhöhung der Proteinmenge zurückzuführen ist. Demzufolge liegt es nahe, dass dieser Effekt aufgrund von Veränderungen der Rezeptor-Endozytose zustande kommt. Dies sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden.

Die Stimulation mit EGF initiiert die Internalisierung des Rezeptors über frühe Endosomen, die durch mikroskopische Experimente einfach nachzuweisen ist. Deshalb wurde die Ligen-abhängige Entstehung EGF-Rezeptor haltiger Vesikel in infizierten und nicht infizierten Zellen mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Hierfür wurden AGS Zellen mit P1 infiziert und 20 h nach der Infektion für 5 min mit EGF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und mit einem anti EGF-Rezeptor Antikörper (rot) gefärbt. Die Analyse mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop zeigt deutlich, dass die Stimulation mit EGF in *H. pylori* infizierten Zellen keine Vesikelformation induziert (**Abb. 4.8A**). In nicht infizierten Zellen sind die Vesikel hingegen klar zu erkennen. Um zu demonstrieren, dass es sich bei den EGF-Rezeptor haltigen Vesikeln in nicht infizierten Zellen auch tatsächlich um frühe Endosomen handelt, wurden Zellen zusätzlich mit einem Antikörper behandelt, der EEA1 (*early endosome antigen 1*, rot) als Markerprotein für frühe Endosomen anfärbt. Die Proben wurden anschließend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (**Abb. 4.8C**). In nicht infizierten Zellen ist die EGF induzierte Kolokalisation von EEA1 und EGF-Rezeptor in vesikulären Strukturen klar zu erkennen (**Abb. 4.8C**; links). In *H. pylori* infizierten Zellen kolokalisieren die Proteine dagegen nicht, was nochmals demonstriert, dass die Bildung EGF-Rezeptor haltiger, früher Endosomen in infizierten Zellen blockiert ist (**Abb. 4.8C**; rechts).

Da nach EGF-Stimulation hier eine Bildung EGF-Rezeptor haltiger früher Endosomen in infizierten Zellen nicht beobachtet werden konnte, weisen die Daten darauf hin, dass die en-

dozytische Aufnahme des EGF-Rezeptors in *H. pylori* infizierten Zellen tatsächlich inhibiert ist.

Um zu zeigen, dass endozytische Vorgänge in infizierten Zellen nicht generell blockiert sind, wurde ebenfalls die Liganden-abhängige Aufnahme von c-Met untersucht (Abb. 4.8B&D). Hierfür wurden infizierte und nicht infizierte Zellen für 5 min mit HGF stimuliert und anschließend mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Sowohl die Färbungen von c-Met allein (Abb. 4.8B) als auch konfokale Koloalisations-Studien von c-Met und EEA1 (Abb. 4.8D) zeigen deutlich, dass die endozytische Aufnahme von c-Met sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zellen funktioniert. In beiden Ansätzen sind deutlich c-Met haltige, frühe Endosomen nach Liganden-Behandlung zu erkennen.

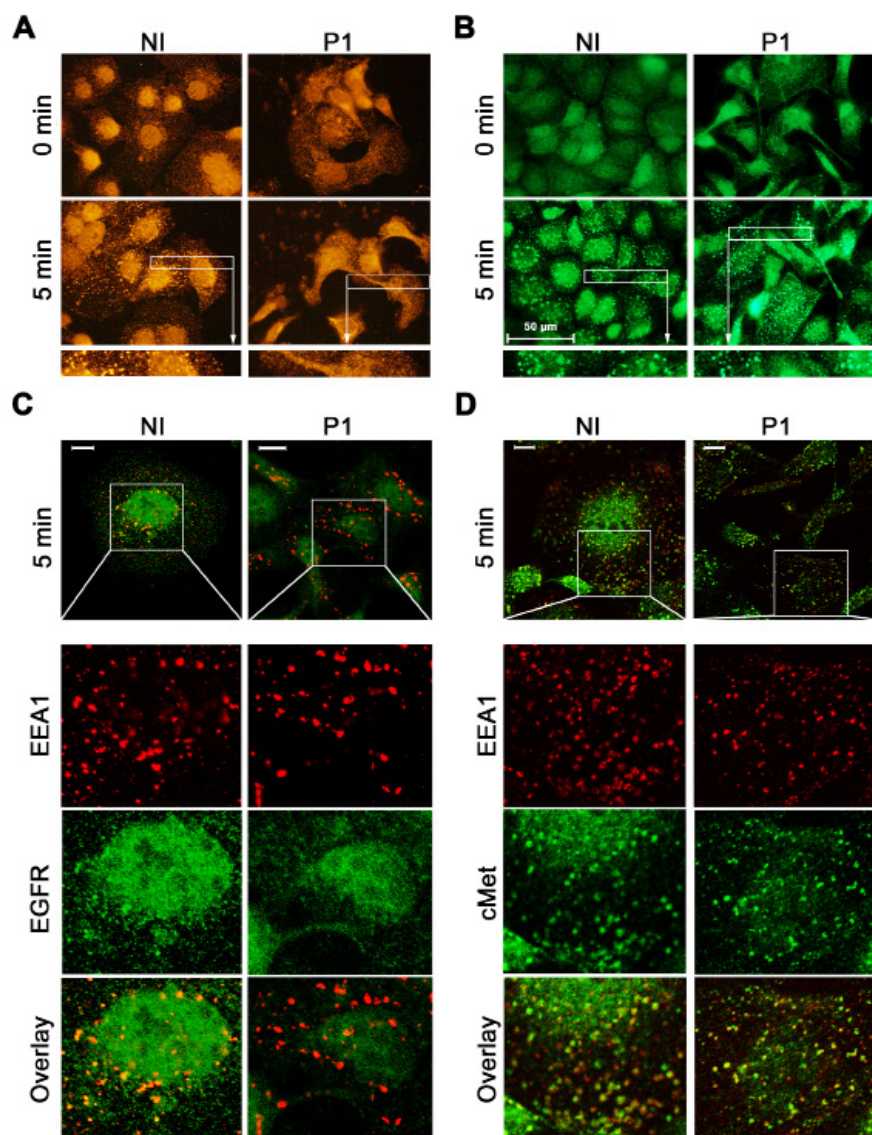


Abb. 4.8: Immunfluoreszenz-Analyse der Liganden-abhängigen EGF-Rezeptor Endozytose von *H. pylori* infizierten Zellen.

AGS-Zellen wurden 20 h mit P1 (MOI 100) infiziert. Infizierte (P1) und nicht infizierte (NI) Zellen wurden 5 min mit 100 ng/ml EGF oder 100 ng/ml HGF stimuliert und mit entsprechenden Antikörpern gefärbt. Vesikelformationen sind in A & B durch vergrößerte Ausschnitte (weisser Rahmen, unterer Bildabschnitt) hervorgehoben. A) Epifluoreszenz-Analyse von Zellen, die mit einem anti EGFR-Antikörper gefärbt (rot) wurden. B) Epifluoreszenz-Analyse von Zellen, die mit einem anti c-Met-Antikörper gefärbt (grün) wurden. C) Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von Zellen, die mit einem anti EGFR-Antikörper (grün) und einem anti EEA1-Antikörper gefärbt wurden (rot). D) Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von Zellen, die mit einem anti c-Met-Antikörper (grün) und einem anti EEA1-Antikörper gefärbt wurden (rot).

Um die mikroskopischen Daten zu bekräftigen, wurde die Endozytose des EGF-Rezeptors in einem Zeitverlaufsexperiment untersucht. Dabei wurde die zelluläre Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem EGF (Alexa488 EGF) gemessen, das zusammen mit dem EGF-Rezeptor endozytiert wird. Durch eine FACS-Analyse konnte die Menge von internalisiertem EGF quantifiziert werden (Abb. 4.9A&B). Hierbei zeigte sich, dass die Aufnahme von EGF in infizierte

Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen stark inhibiert ist. Dies bestätigt die Hypothese einer *H. pylori* induzierten Blockade der EGF-Rezeptor Endozytose nochmals. Veränderungen der EGF-Rezeptor Proteinexpression, die zu dem Anstieg der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition führen könnten, wurden ebenfalls mittels Immunoblotanalyse ausgeschlossen (Abb. 4.5 und 4.9C). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die *H. pylori* induzierte Erhöhung der EGF-Rezeptor Oberflächenexpression tatsächlich durch eine selektive Inhibierung der EGR-Endozytose verursacht wird.

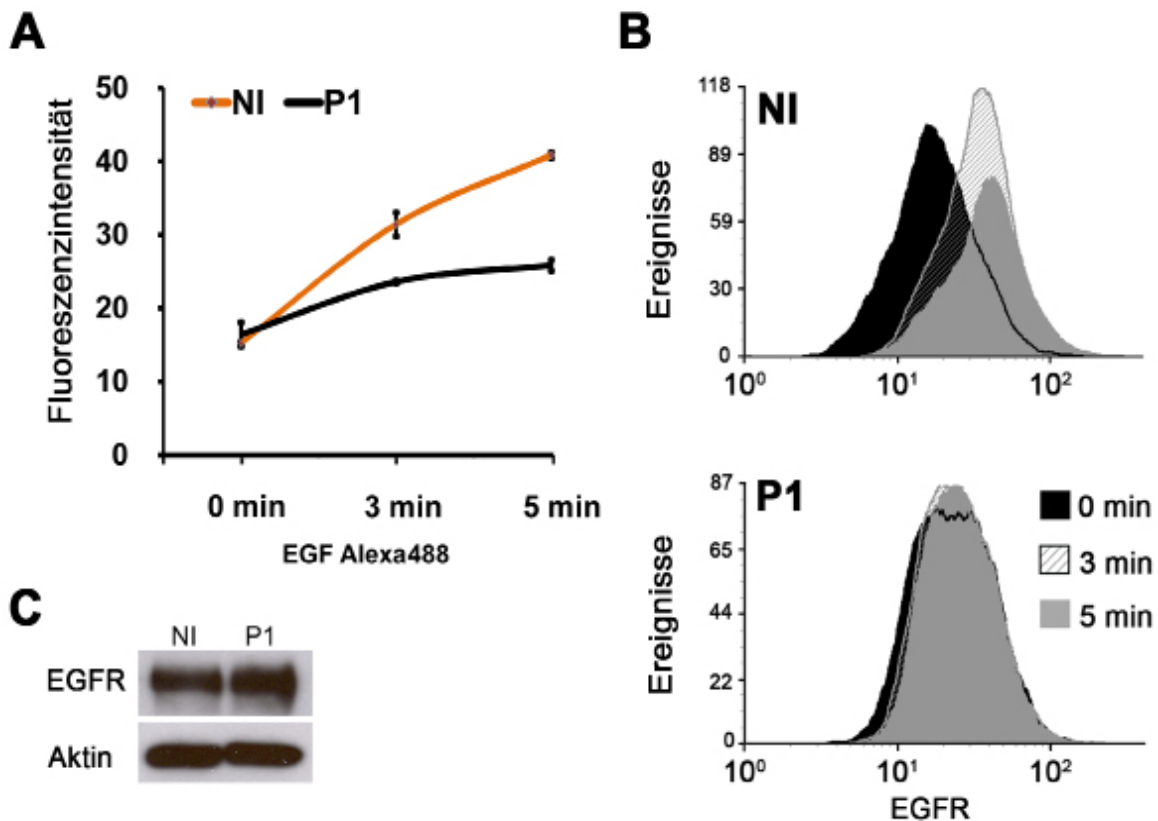


Abb. 4.9: FACS-Analyse der Liganden-induzierten EGF-Rezeptor Internalisierung in *H. pylori* infizierten Zellen. AGS-Zellen wurden 20 h mit P1 (MOI 100) infiziert. Infizierte (P1) und nicht infizierte (NI) Zellen wurden mit 50 ng/ml EGF Alexa488 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 0, 3 und 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend gewaschen. Der intrazelluläre Gehalt an EGF Alexa488 wurde mittels FACS bestimmt. A) Liniendiagramm: Fluoreszenzmedian von internalisiertem EGF Alexa488. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. B) Histogramme mit Fluoreszenzintensitäten des intrazellulären Gehalts an EGF Alexa488 in analysierten Zellpopulationen. C) Immunoblotanalyse der EGFR-Expression. Zellen wurden lysiert und mit einem anti EGFR-Antikörper analysiert. Für die Ladekontrolle wurde ein anti β -Aktin-Antikörper eingesetzt.

4.1.4. *H. pylori* inhibiert auch die Liganden-abhängige EGF-Rezeptor Degradierung

Die Liganden-abhängige Internalisierung des EGF-Rezeptors führt neben der Initiation von intrazellulären Signalkaskaden auch zu der lysosomalen Degradierung des Rezeptors, die durch die Ubiquitin-Ligase Cbl eingeleitet wird. Die Ligase ubiquitinyliert den Rezeptor und markiert ihn so für den Degradationsweg (Alwan *et al.*, 2003; Waterman *et al.*, 1999). Da der EGF-Rezeptor in *H. pylori* infizierten Zellen nicht mehr internalisiert werden kann, müsste

hier auch die Degradierung des EGF-Rezeptors blockiert sein. Dies sollte mit dem folgenden Experiment überprüft werden. Zusätzlich sollte getestet werden, ob der Effektor CagA in den Prozess involviert sein könnte. Für den Versuch wurden die Zellen mit P1 und der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA infiziert. Der EGF-Rezeptor wurde nach EGF-Stimulation aus infizierten und nicht infizierten Zellen immunopräzipitiert. Hierbei stellte sich heraus, dass der Rezeptor in Zellen, die 20 h mit P1 infiziert wurden, tatsächlich nicht mehr degradiert wird. Im Gegensatz dazu konnte aus nicht infizierten Zellen oder Zellen, die mit P1 Δ cagA infiziert wurden, nach 90 min EGF-Stimulation kein EGF-Rezeptor mehr detektiert werden, da der Rezeptor zu dem Zeitpunkt der Stimulation hier bereits degradiert war (Abb. 4.10). Demzufolge unterstützen die Daten die Aussage, dass die Internalisierung des EGF-Rezeptors in infizierten Zellen blockiert ist, wodurch auch die Cbl abhängige Degradierung gehemmt wird. Auffällig ist, dass die Proteinmenge in P1 infizierten Zellen trotz der fehlenden Degradierung nicht zunimmt. Das spricht dafür, dass die Zelle oder das Bakterium zusätzliche Mechanismen einleitet um die Neusynthese des Rezeptors zu drosseln.

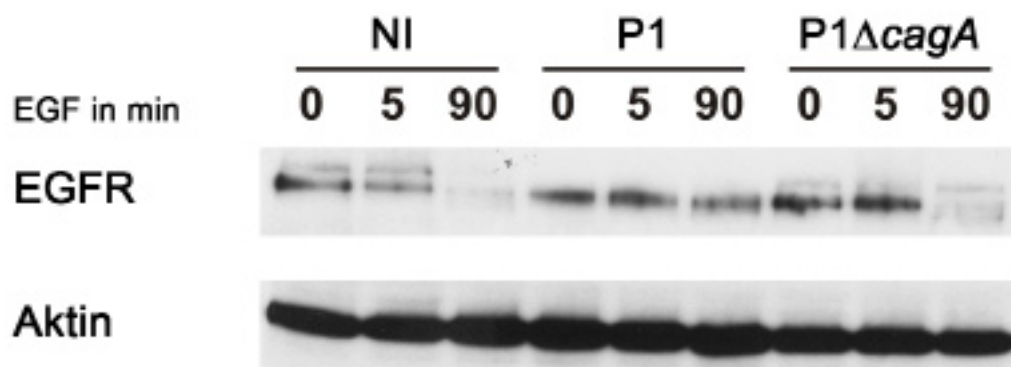


Abb. 4.10: Immunoblotanalyse von EGF-Rezeptor Immunopräzipitaten aus P1 und P1 Δ cagA infizierten Zellen. AGS-Zellen wurden 20 h mit P1 oder der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die Ansätze 0, 5 und 90 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Der EGF-Rezeptor wurde mit einem monoklonalen anti EGFR-Antikörper immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden per Immunoblot mit einem polyklonalen anti EGFR-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle wurde Ganzzelllysate in Kombination mit einem anti β -Aktin-Antikörper eingesetzt.

4.1.5. Die Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose wird durch die eukaryotische Nicht-Rezeptor Kinase c-Abl eingeleitet

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Nicht-Rezeptor Kinase c-Abl die Internalisierung des EGF-Rezeptors reguliert (Tanos und Pendergast, 2006). Hierbei inhibiert die Kinase die Rezeptor-Endozytose durch die Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173. In Infektionen mit *H. pylori* übernimmt c-Abl die Phosphorylierung von CagA nach längeren Infektionsperioden, wenn Src inhibiert ist (Pope *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). Aufgrund des Einflusses von c-Abl auf die Endozytose des EGF-Rezeptors und der Interaktion von c-Abl mit CagA in *H. pylori* infizierten Zellen wurde die Rolle von c-Abl in der *H. pylori* vermittelten Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose überprüft. Hierfür wurde die Liganden-abhängige Formierung EGF-Rezeptor haltiger Vesikel unter dem Einfluss des c-Abl-Inhibitors STI-571 (STI) mittels Immunofluoreszenz Analyse untersucht (Abb. 4.11). In nicht infizierten Zellen konnte die For-

mierung EGF-Rezeptor haltiger Vesikel sowohl in unbehandelten als auch in Inhibitor-behandelten Ansätzen beobachtet werden (**Abb. 4.11**; links). In infizierten Zellen konnte die Liganden-abhängige Vesikelformation nur dann detektiert werden, wenn sie vorher mit dem c-Abl-Inhibitor behandelt wurden (**Abb. 4.11**; rechts). Dies zeigt, dass c-Abl tatsächlich in die *H. pylori* induzierte Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose involviert ist und lässt darauf schließen, dass die Kinase den EGF-Rezeptor in infizierten Zellen eventuell durch eine gezielte Phosphorylierung an seiner Internalisierung hindert.

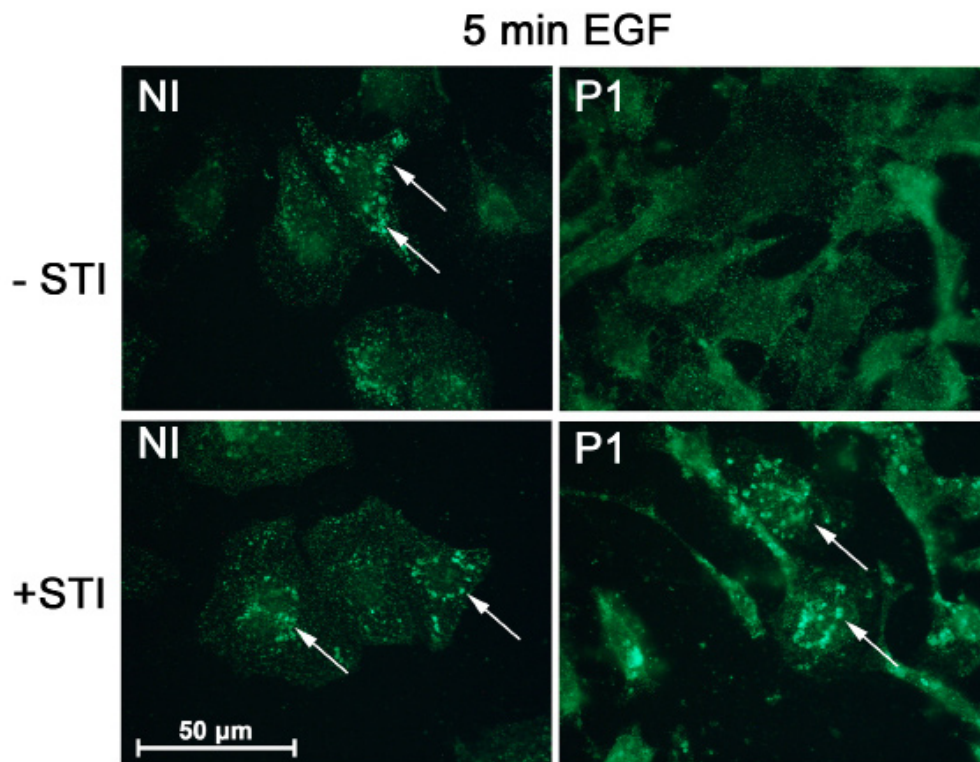


Abb. 4.11: Immunofluoreszenz-Analyse der Liganden-abhängigen EGF-Rezeptor Endozytose in *H. pylori* infizierten Zellen nach Behandlung mit dem c-Abl Inhibitor STI.

AGS-Zellen wurden mit P1 (MOI 100) infiziert. Die Inhibitorbehandlung erfolgte 2 h vor der Infektion mit einer STI-Konzentration von 10 µM. 20 h nach der Infektion wurden infizierte (P1) und nicht infizierte (NI) Zellen 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Proben wurden mit einem anti EGFR-Antikörper gefärbt (grün). Die Formierung früher, EGFR-haltiger Endosomen ist mit Pfeilen markiert.

Die Auswirkungen des c-Abl Inhibitors wurden auch mittels FACS-Analyse untersucht, um die mikroskopischen Daten zu bestätigen. Im Gegensatz zu infizierten, unbehandelten Zellen zeigten infizierte Zellen, die vorher mit dem Inhibitor behandelt wurden, keine Erhöhung der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition. Die FACS-Daten demonstrieren demnach nochmals, dass die CagA abhängige Hochregulation der EGF-Rezeptor Oberflächenexpression auf *H. pylori* infizierten Zellen von c-Abl reguliert wird (**Abb. 4.12**).

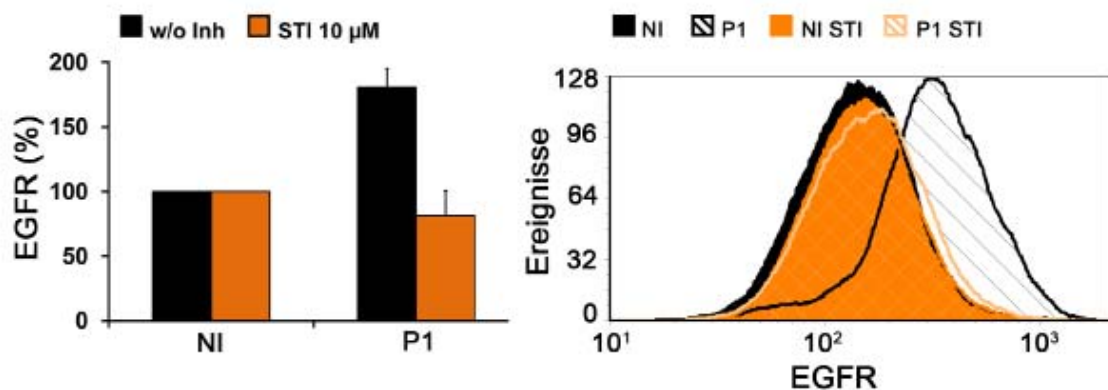


Abb. 4.12: FACS-Analyse der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition von *H. pylori* infizierten Zellen nach STI Behandlung.

AGS-Zellen wurden mit P1 (MOI 100) infiziert. 2 h vor der Infektion wurden die Zellen mit 10 µM STI inkubiert. Infizierte (P1) und nicht infizierte (NI) Zellen wurden 20 h nach der Infektion wie in Abb. 4.4 mit einem anti EGFR-Antikörper oder der Isotypenkontrolle gefärbt und per FACS analysiert. Links: Säulendiagramm mit prozentualer EGFR-Oberflächenexposition. Rechts: Histogramm Fluoreszenzintensitäten der EGFR-Oberflächenexposition auf den entsprechenden Zellpopulationen. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Kinase-Inhibitoren können unspezifisch auch andere Kinase hemmen. Auch für den c-Abl Inhibitor STI konnte bereits gezeigt werden, dass er zusätzlich die Aktivität des PDGF-Rezeptors (*Platelet-derived growth factor*) und des Zytokin-Rezeptors c-Kit beeinflussen kann (Carroll *et al.*, 1997; Heinrich *et al.*, 2000; Nurmio *et al.*, 2008).

Deshalb sollte der Einfluss von c-Abl auf die EGF-Rezeptor Oberflächenexposition infizierter Zellen unter Bedingungen untersucht werden, in denen nur die Funktion von c-Abl gezielt inhibiert wird. Hierfür wurde die EGF-Rezeptor Oberflächenpopulation infizierter Zellen mittels FACS analysiert, die zuvor mit siRNA Molekülen transfiziert wurden, die die Proteinexpression von c-Abl gezielt unterdrücken (Abb. 4.13). Unspezifische Transfektionseffekte wurden durch den Einsatz von Luciferase spezifischen siRNA Molekülen in einem Kontrollansatz ausgeschlossen.

Tatsächlich zeigten infizierten Zellen in denen c-Abl auf Proteinebene nicht mehr per Immunoblot detektierbar war, einen Rückgang der erhöhten EGF-Rezeptorpopulation auf der Oberfläche infizierter Zellen (Abb. 4.13A&B). Die Kontrollansätze zeigten hingegen eine starke Erhöhung der EGF-Rezeptor Oberflächenexpression, womit die Ergebnisse des Experiments mit Inhibitor-behandelten Zellen bestätigt werden konnten.

Demzufolge konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die Endozytose des EGF-Rezeptors in *H. pylori* infizierten Zellen wieder hergestellt werden kann, wenn c-Abl entweder durch Inhibitor-Behandlung inaktiviert wird oder durch siRNA Transfektionen inhibiert wird. Demzufolge konnte die Nicht-Rezeptor Kinase c-Abl hier tatsächlich als ein Schlüsselfaktor für die *H. pylori* vermittelte Blockade der EGF-Rezeptor Internalisierung identifiziert werden.

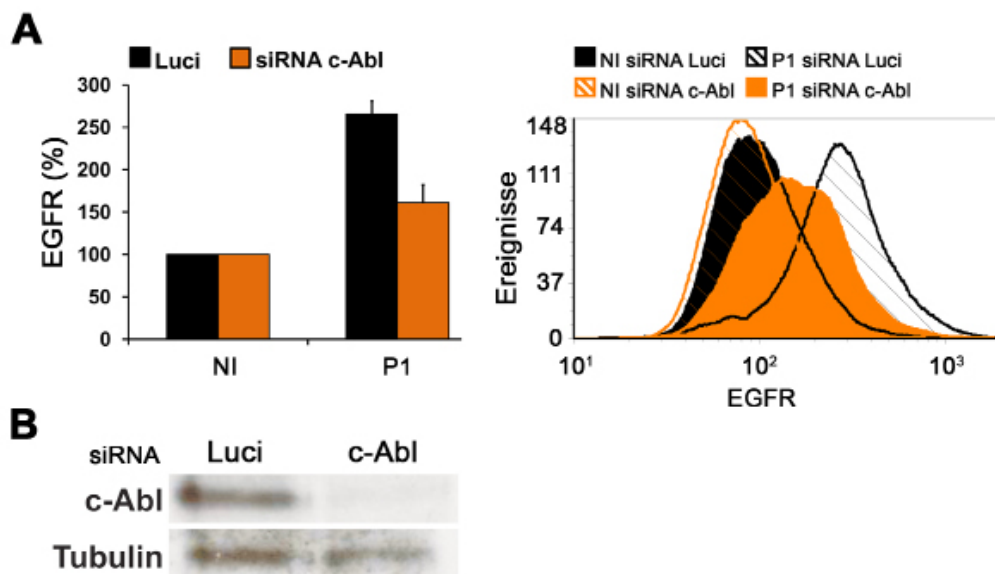


Abb. 4.13: FACS-Analyse der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition von *H. pylori* infizierten Zellen nach siRNA Transfektion.

A) AGS-Zellen wurden drei Tage vor der Infektion mit Luciferase und c-Abl spezifischen siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden mit P1 (MOI 100) infiziert. 20 h nach der Infektion wurden die infizierten (P1) und nicht infizierten (NI) Zellen geerntet und mit einem anti EGFR-Antikörper oder der Isotypenkontrolle gefärbt. Links: Säulendiagramm zeigt prozentuale Rezeptor-Oberflächenexpositionen. Rechts: Histogramm illustriert Fluoreszenzintensitäten der EGFR-Oberflächenexposition auf den entsprechenden Zellpopulationen. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. B) Immunoblotanalyse siRNA transfizierter Zellen drei Tage nach der Transfektion. Zellen wurden mit siRNAs gegen Luciferase oder c-Abl transfiziert. Zelllysate wurden mit einem anti c-Abl-Antikörper analysiert. Die Ladekontrolle erfolgte mit einem anti β -Tubulin-Antikörper.

4.1.6. c-Abl inhibiert die EGF-Rezeptor Endozytose durch eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173

Da c-Abl die EGF-Rezeptor Endozytose über eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173 blockieren kann, wurde die Rolle dieses Tyrosins in der c-Abl abhängigen Endozytose-Inhibierung *H. pylori* infizierter Zellen näher untersucht (Tanos und Pendergast, 2006). Für die Analyse wurden Zellen mit einer plasmidkodierten EGF-Rezeptor Mutante transfiziert und mittels FACS analysiert (**Abb. 4.14A**). Die Mutante trägt eine Aminosäuresubstitution, in der das EGF-Rezeptor Tyrosin Y1173 durch Phenylalanin ersetzt wurde (EGFR Y1173F). Dadurch kann die Mutante an dieser Stelle nicht mehr durch c-Abl phosphoryliert werden. Um unspezifische Internalisierungseffekte zu vermeiden, wurde die Expression des endogen kodierten EGF-Rezeptors durch eine siRNA vermittelte Runterregulation des Proteins inhibiert. Als Kontrolle wurde ein Plasmid eingesetzt, welches für das EGF-Rezeptor Wildtypgen kodiert (EGFR WT). Sowohl die verringerte Proteinexpression als auch die Überexpression der Konstrukte EGFR Y1173F (MUT) und EGFR WT (WT) wurden mittels Immunoblotanalyse überprüft (**Abb. 4.14B**). Nach der Transfektion wurden die Zellen 20 h mit P1 infiziert und für die FACS-Analyse wie in **Abb. 4.4** gefärbt. Zellen die mit der EGF-Rezeptor Mutante transfiziert wurden zeigten im Gegensatz zu Wildtyp-transfizierten Zellen eine Verringerung der *H. pylori* induzierten EGF-Rezeptor Hochregulation auf der Zelloberfläche (**Abb. 4.14A**).

Da diese Aminosäureposition die Zielphosphorylierungsstelle von c-Abl ist, liegt die Vermutung nahe, dass die c-Abl abhängige Blockade der EGF-Rezeptor Internalisierung in infizierten Zellen über die Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosinrests Y1173 verläuft.

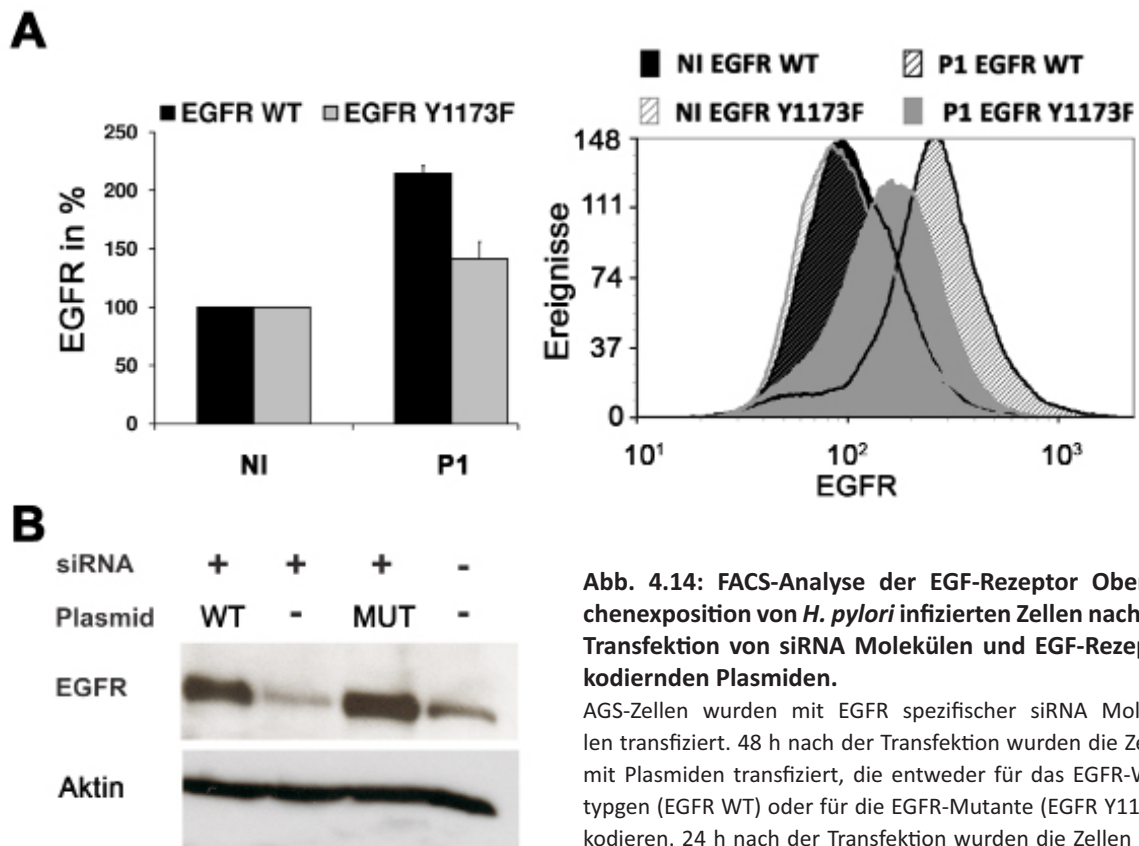


Abb. 4.14: FACS-Analyse der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition von *H. pylori* infizierten Zellen nach der Transfektion von siRNA Molekülen und EGF-Rezeptor kodierenden Plasmiden.

AGS-Zellen wurden mit EGFR spezifischer siRNA Molekülen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Plasmiden transfiziert, die entweder für das EGFR-Wildtypen (EGFR WT) oder für die EGFR-Mutante (EGFR Y1173F) kodieren. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen 20 h mit P1 (MOI 100) infiziert. A) Infizierte (P1) und nicht infizierte (NI) Zellen wurden wie in Abb. 4.4 gefärbt und per FACS analysiert. Links: Säulendiagramm zeigt prozentuale Rezeptor-

Oberflächenexpositionen der analysierten Zellpopulationen. Rechts: Histogramm illustriert Fluoreszenzintensitäten der EGFR-Oberflächenexposition auf den entsprechenden Zellpopulationen. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. B) Immunoblotanalyse transfizierter Zellen. Die Zellen wurden wie in A transfiziert. Die Analyse der Proteinexpression von endogenem und exogenem EGF-Rezeptor erfolgte mittels Immunoblot. Hierfür wurde ein anti EGFR-Antikörper eingesetzt. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti β -Aktin-Antikörper durchgeführt.

Als nächstes sollte der Phosphorylierungs-Status des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173 unter Verwendung eines Phospho-spezifischen Antikörpers untersucht werden. Hierbei sollte auch der Einfluss von transloziertem CagA untersucht werden. Deshalb wurden die Zellen mit P1 oder den isogenen Deletionsmutanten $P1\Delta cagA$ und $P1\Delta virB11$ infiziert. $P1\Delta virB11$ exprimiert kein funktionales T4SS und kann demnach kein CagA translozieren.

Da die c-Abl abhängige Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173 durch die Stimulation mit EGF induziert wird, wurden die Zellen 20 h nach der Infektion 0, 5 und 90 min mit EGF stimuliert. Der EGF-Rezeptor Phosphorylierungs-Status des Tyrosins Y1173 wurde mittels Immunoblot überprüft.

Die EGF abhängige Phosphorylierung des Tyrosins ist in nicht infizierten Zellen und in Zellen, die mit den Mutanten infiziert wurden nach 90 min Stimulation nicht mehr zu detektieren. Dies lässt sich damit erklären, dass der EGF-Rezeptor zu diesem Zeitpunkt bereits internalisiert und in den lysosomalen Degradationsweg eingeleitet wurde. Interessanterweise zeigen

mit P1 infizierte AGS Zellen eine verlängerte Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173, die auch nach 90 min EGF-Stimulation noch detektierbar ist (Abb. 4.15).

Diese Ergebnisse verdeutlichen nicht nur, dass eine Infektion mit *H. pylori* den EGF-Rezeptors Phosphorylierungs-Status des EGF-Rezeptor an dem Tyrosin Y1173 verändert, sondern demonstrieren auch, dass dieser Effekt, genauso wie die Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose, CagA-abhängig ist. CagA, c-Abl und die Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173 stehen demnach im direkten Zusammenhang einer *H. pylori* vermittelten Hemmung der EGF-Rezeptor Endozytose.

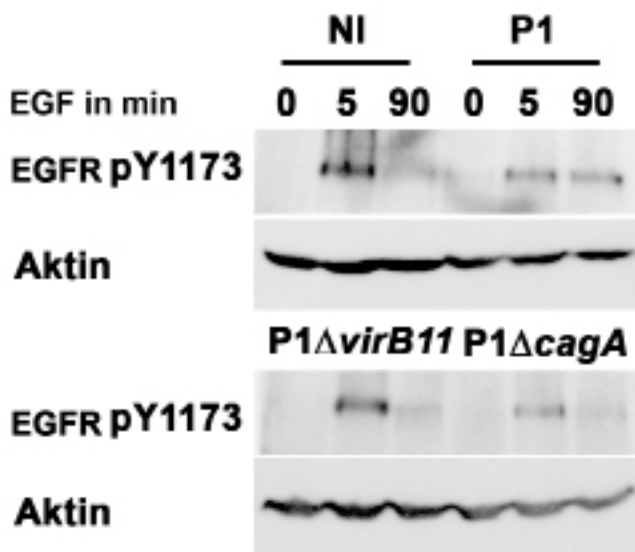


Abb. 4.15: Immunoblotanalyse der Ligen-abhängigen Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173 in *H. pylori* infizierten Zellen.

Zelllysate wurden per Immunoblot unter Verwendung eines phosphospezifischen anti EGFR pY1173-Antikörpers untersucht. Für die Ladekontrolle wurde ein anti β Aktin-Antikörper verwendet. AGS-Zellen wurden 20 h mit P1 oder den isogenen Deletionsmutanten P1ΔcagA und P1Δ virB11 infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die Ansätze 0, 5 und 90 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert.

4.2. Diskussion Ergebnisteil 2-*H. pylori* inhibiert die Endozytose des EGF-Rezeptors

4.2.1. *H. pylori* blockiert gezielt die EGF-Rezeptor Endozytose und erhöht so die Oberflächenexposition der Rezeptor-Tyrosinkinase

Interessanterweise wurde in gastrischen Biopsien aus dem Antrum *H. pylori* infizierter Patienten sowohl eine erhöhte EGF als auch EGF-Rezeptor Expression detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass es durch Infektionen mit *H. pylori* zu einer Verstärkung der EGF-Rezeptor Signalkaskade kommt, die die Entstehung von Magenkrebs begünstigt (Coyle *et al.*, 1999). Dennoch ist der genaue Zusammenhang zwischen *H. pylori*, EGF-Rezeptor Signaltransduktion und Krebsentstehung bis heute nicht vollständig bewiesen, und die Tatsache, dass *H. pylori* auch die Entstehung von Magengeschwüren begünstigt, ist schwer mit einer erhöhten Zellproliferation in Verbindung zu bringen. Magengeschwüre entstehen durch eine gestörte Wundheilung, die durch eine inhibierte Zellproliferation von verletztem Gewebe hervorgerufen wird.

Aus diesem Grund sollte in diesem Abschnitt der Arbeit analysiert werden, ob und wie *H. pylori* den EGF-Rezeptor nach Infektionszeiten von 20 h beeinflusst. Diese Infektionsdauer wurde deshalb gewählt, weil es *in vitro* nicht möglich ist, Infektionen über mehrere Tage oder Monate durchzuführen, da die Zellen bei der Verwendung von hohen MOIs nach 24 h bereits apoptotisch werden.

Interessanterweise konnte hier nicht nur gezeigt werden, dass längere Infektionszeiten mit *H. pylori* einen Anstieg der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition hervorrufen, sondern auch welche Mechanismen diesem Effekt zugrunde liegen (**Abb. 4.16**). Die erhöhte EGF-Rezeptor Oberflächenexposition basiert hierbei nicht auf einer erhöhten Proteinexpression, sondern auf einer *H. pylori* induzierten Blockade der EGF-Rezeptor Internalisierung. Diese wird durch eine CagA abhängige Aktivierung der Kinase c-Abl hervorgerufen. Durch die Aktivierung von c-Abl kommt es zu einer verlängerten EGF-Rezeptor Phosphorylierung des Tyrosins Y1173, welche die Endozytose des Rezeptors blockiert und so die Menge an EGF-Rezeptor Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen erhöht. Die Tatsache, dass die verlängerte EGF-Rezeptor Phosphorylierung des Tyrosins Y1173 erst nach EGF-Stimulation induziert wird, obwohl c-Abl aktiviert ist, erklärt sich dadurch, dass der EGF-Rezeptor erst durch die Stimulation Homo- bzw. Heterodimere bildet, die phosphoryliert werden können.

Bisher standen Erhöhungen der Rezeptorexposition auf der Oberfläche *H. pylori* infizierter Zellen immer in einem Zusammenhang mit einer erhöhten Proteinexpression. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das in Leukozyten und Endothelzellen exprimierte Adhäsionsmolekül ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule 1*) auf der Oberfläche von Makrophagen-ähnlichen Zellen hochreguliert wird. Dieser Effekt wird durch das T4SS eingeleitet und basiert auf einer erhöhten Proteinexpression (Moese *et al.*, 2002). Die Daten der vorliegenden Arbeit demonstrieren den ersten endozytotischen Mechanismus, durch den *H. pylori*

eine Erhöhung der Rezeptorpopulation auf der Oberfläche infizierter Zellen induzieren kann, ohne die Proteinexpression zu erhöhen. Ob auf diese Art und Weise auch für das Pathogen wichtige Adhäsine auf der Oberfläche von Wirtszellen hochreguliert werden, ist Gegenstand nachfolgender Untersuchungen.

4.2.2. Der Effektor CagA - das multifaktorielle Adapterprotein von *H. pylori*

Die Beobachtung, dass der bakterielle Virulenzfaktor CagA in diesen Mechanismus involviert ist, erweitert das Verständnis von CagA und seiner Bedeutung innerhalb des Infektionsprozesses. Bisher ging man davon aus, dass CagA die Eigenschaften von Adapterproteinen nachahmt um die Signale von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen weiterzuleiten. Dadurch steuert CagA proliferative Vorgänge, Adhäsion und zytoskeletale Veränderungen des Epithels (Amieva und El Omar, 2008). Auch in dieser Studie kann CagA eine Verbindung zu einer Rezeptor-Tyrosinkinase nachgewiesen werden, die wichtige Prozesse wie Zellteilung reguliert. Demzufolge unterstützen die Daten die Hypothese, dass die Hauptfunktion von CagA in der Wirtszelle, die Manipulation von Signaltransduktionswegen ist und erweitern das Bild CagA abhängiger Prozesse in *H. pylori* infizierten Zellen.

Interessant ist auch, dass der Effekt unabhängig von der Phosphorylierung des Effektors auftritt. Dies deutet darauf hin, dass die von c-Abl vermittelte Phosphorylierung von CagA in der späten Infektionsphase hier nicht von Bedeutung ist, obwohl beide Proteine in die Erhöhung der EGF-Rezeptor Oberflächenexposition involviert sind. Dass CagA c-Abl Phosphorylierungs-unabhängig aktivieren kann spricht dafür, dass die kürzlich publizierte Interaktion beider Proteine ebenfalls Phosphorylierungs-unabhängig ist, obwohl in dem Komplex phosphoryliertes CagA zu finden ist (Tammer *et al.*, 2007). Darüber hinaus könnten aber auch andere Mechanismen für die Aktivierung von c-Abl in Frage kommen. Eine CagA abhängige Aktivierung einer c-Abl-aktivierenden Kinase oder eine CagA induzierte Konformationsänderung von c-Abl könnten hier diskutiert werden (Smith und Mayer, 2002).

4.2.3. Die Zusammenhänge zwischen Rezeptor-Endozytose und Ubiquitinylierung

Die Tatsache, dass die Degradierung des EGF-Rezeptors in infizierten Zellen blockiert ist, könnte damit zusammen hängen, dass der EGF-Rezeptor nicht internalisiert werden kann und deshalb den lysosomalen Abbauweg nicht erreicht. Die inhibierte Degradation könnte aber auch auf eine gestörte Ubiquitinylierung zurückgeführt werden, die normalerweise durch die Ubiquitin-Ligase Cbl vermittelt wird. Nicht-internalisierende EGF-Rezeptoren zeigen häufig eine gestörte Interaktion mit dem Cbl Adapterprotein, was schließlich zu einer Blockierung der Rezeptor-Degradierung führt (Ceresa und Schmid, 2000; Huang *et al.*, 2006; Levkowitz *et al.*, 1999; Marmor und Yarden, 2004). Da eine weitere Studie außerdem

zeigen konnte, dass die Aktivierung von c-Abl die Akkumulation von Cbl an der Plasmamembran inhibiert und somit die Rekrutierung von Cbl zum EGF-Rezeptor verhindert, ist davon auszugehen, dass die fehlende Degradierung tatsächlich auf einer fehlenden Ubiquitinylierung basiert (Tanos und Pendergast, 2006). Dies könnte wiederum zur Folge haben, dass der EGF-Rezeptor nicht mehr internalisiert wird, da die Ubiquitinylierung ein wichtiger Schritt für die Endozytose des EGF-Rezeptors ist (Sorkin und Goh, 2008; Waterman *et al.*, 2002). Zusammenfassend würde das bedeuten, dass eine CagA abhängige Aktivierung von c-Abl den EGF-Rezeptor in infizierten Zellen phosphoryliert und dadurch die Rekrutierung von Cbl verhindert. Dies führt schließlich zu einer Inhibierung der EGF-Rezeptor Endozytose und blockiert so ebenfalls seine Degradierung. Um diese Hypothese zu beweisen, müsste der Ubiquitinylierungsstatus des EGF-Rezeptors in infizierten, unbehandelten Zellen und infizierten, transfizierten Zellen untersucht werden, die die EGFR Y1173F Mutante überexprimieren.

4.2.4. Schlusswort und Modell

Die Studie liefert das erste Modell (**Abb. 4.16**) der gezielten Manipulation einer der wichtigsten Rezeptor-Tyrosinkinasen, durch *H. pylori* induzierte Veränderungen endozytotischer Prozesse. Außerdem verweist sie auf einen neuen funktionellen Zusammenhang zwischen dem bakteriellen Effektor CagA und der Nicht-Rezeptor Kinase c-Abl, der erst nach längeren Infektionsperioden zu beobachten ist und über die Phosphorylierung des Effektors und der Regulation der Zellmotilität hinausgeht.

Das Entkoppeln des EGF-Rezeptors von seiner Liganden-abhängigen Internalisierung kann zur zellulären Transformation und somit Krebs führen (Marmor und Yarden, 2004; Polo *et al.*, 2004). Diese Prozesse werden durch eine erhöhte EGF-Rezeptor Signaltransduktion erklärt, die durch große Mengen an EGF-Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche initiiert wird und zu einer erhöhten Zellproliferation führt. Die c-Abl abhängige, verlängerte Phosphorylierung des spezifischen EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173 und die inhibierte Rezeptor-Degradation, sprechen für eine Verstärkung der EGF-Rezeptor Signaltransduktion in *H. pylori* infizierten Zellen. Dies unterstützt die Hypothese, dass *H. pylori* das Risiko der Tumorentstehung über einer Manipulation des EGF-Rezeptor Signalwegs erhöht. Ob diese Verstärkung aber tatsächlich zutrifft, ist Gegenstand des nächsten Ergebnisteils.

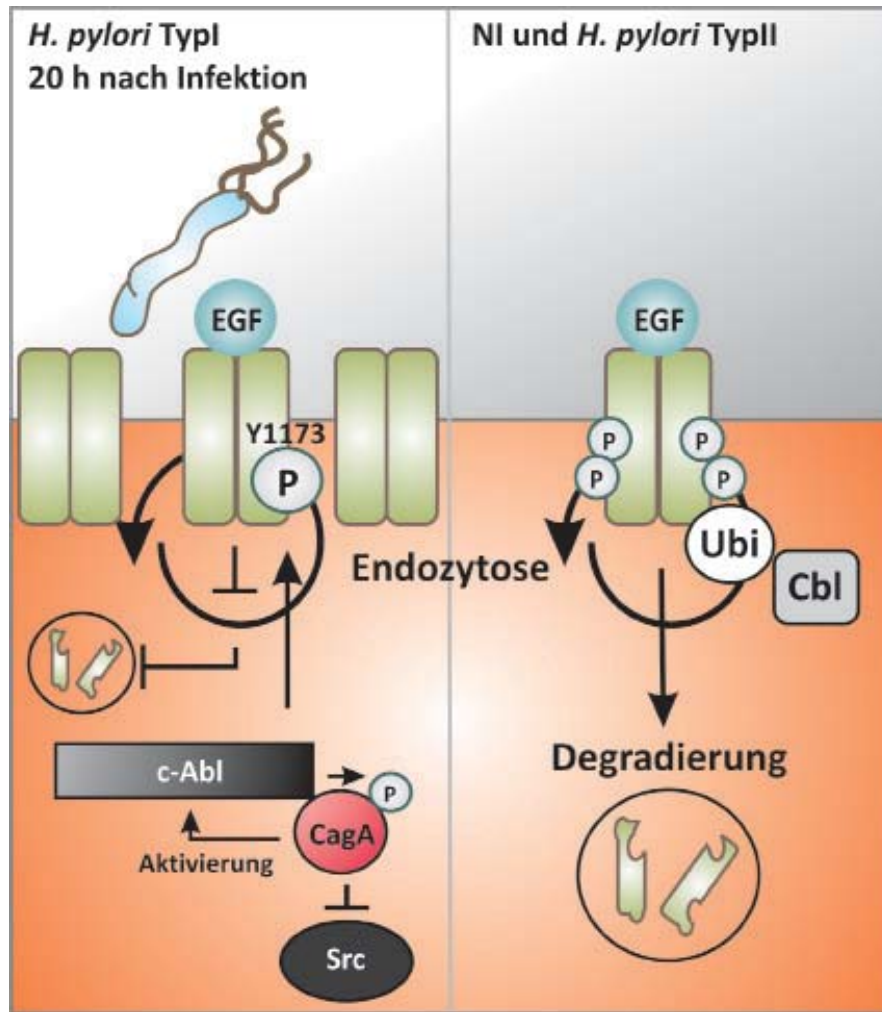


Abb. 4.16: Modell der *H. pylori* induzierten Blockade der EGFR-Endozytose.

In nicht infizierten Zellen (NI) und Zellen, die mit *H. pylori* Typ II Stämmen infiziert wurden, wird der EGF-Rezeptor nach der Liganden-Bindung durch die rekrutierte Ubiquitin-Ligase Cbl ubiquitinyliert (Ubi), internalisiert und in den lysosomalen Degradationsweg eingeleitet. *H. pylori* Typ I Stämme, die ein funktionstüchtiges T4SS exprimieren (P1), inhibieren nach 20 h Infektion die EGFR-Internalisierung durch die Translokation des Effektors CagA. CagA interagiert mit c-Abl, aktiviert die Kinase, und da Src 20 h nach Infektion CagA abhängig inaktiviert ist übernimmt c-Abl die Phosphorylierung des Effektors. Aktiviertes c-Abl verlängert wiederum die EGF abhängige Tyrosin-Phosphorylierung des Liganden-gebundenen EGF-Rezeptors an dem zytoplasmatisch lokalisierten EGFR Tyrosinrest Y1173,

und induziert damit eine Blockade der EGFR-Endozytose. Auch die Degradierung ist inhibiert, was darauf hindeutet, dass es durch die blockierte Internalisierung zu einer fehlenden Ubiquitinylierung kommt. Es könnte aber auch sein, dass Cbl durch die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nicht rekrutiert wird und der EGF-Rezeptor deshalb nicht in die Zellen aufgenommen werden kann. Der hier beschriebene Mechanismus führt schließlich zu einer erhöhten EGFR-Oberflächenexposition.

4.3. *H. pylori* hemmt die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch eine CagA abhängige Aktivierung der Phosphatase SHP-2

4.3.1. *H. pylori* inhibiert den EGF abhängigen Wundheilungsprozess von infizierten gastrischen Epithelzellen

Das Magenpathogen *H. pylori* ist sowohl mit der Entstehung von Magentumoren als auch Magengeschwüren assoziiert. Im Gegensatz zu Magentumoren, deren Entstehung auf einer unkontrollierten Zellproliferation basiert, entwickeln sich Magengeschwüre durch eine gehemmte Zellproliferation, die nicht mehr in der Lage ist, Wunden des Epithels zu schließen.

In *H. pylori* infizierten Patienten wurde sowohl eine erhöhte Expression des EGF-Rezeptor Liganden EGF als auch des EGF-Rezeptors selbst beobachtet (Keates *et al.*, 2007; Schiemann *et al.*, 2002). Zusammen mit den Beobachtungen der blockierten EGF-Rezeptor Endozytose, unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass *H. pylori* in infiziertem humanem Magenepithel eine verstärkte Zellproliferation induziert und so die Entstehung von Magenkrebs begünstigt (siehe Ergebnisteil 2). Es ist jedoch nach wie vor unbekannt, welchen Einfluss eine *H. pylori* Infektion auf die EGF-Rezeptor Signaltransduktion nach 20 h Infektion ausübt. Außerdem kann man sich bisher nicht erklären, wie es bei einer erhöhten Sekretion von EGF trotzdem zu der Entstehung von Magengeschwüren kommen kann. Aus diesem Grund sollte hier untersucht werden, welche Auswirkungen eine 20 stündige Infektion auf den EGF abhängigen Wundheilungsprozess und die EGF-Rezeptor Signaltransduktion hat.

Inhibierte Wundheilungsprozesse können im Gegensatz zur langwierigen Tumorentstehung experimentell vereinfacht nachgestellt werden. Hierfür werden sogenannte Wundheilungsexperimente durchgeführt, in denen konfluente Zellschichten durch einen durchgehenden Kratzer durchbrochen werden (Verletzung; Wunde). Das Schließen dieser Wunde kann dann

anschließend mikroskopisch nachverfolgt werden (Abb. 4.17). Je langsamer sich die Wunde schließt, desto langsamer schreitet der Wundheilungsprozess voran. Je langsamer

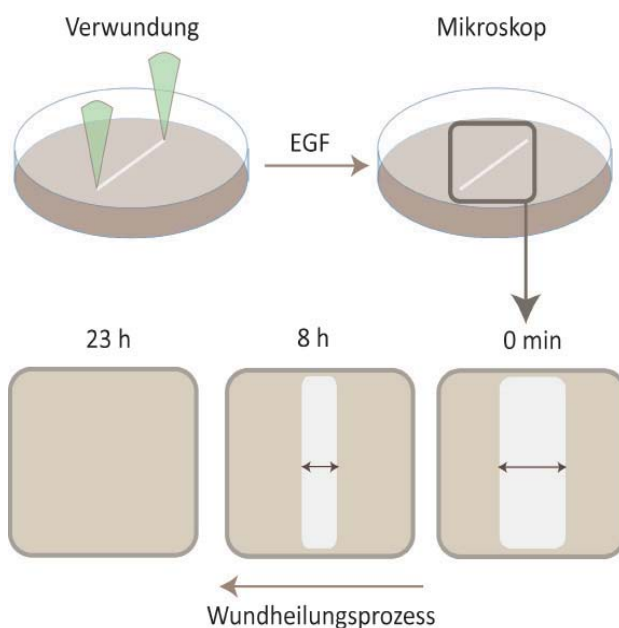


Abb. 4.17: Schematische Darstellung eines Wundheilungs-Experiments nach EGF-Behandlung.

Zellen werden in einer Zellkulturschale zu einer konfluente Zellschicht kultiviert. Anschließend wird mit einer Pipettenspitze ein Kratzer durch die Schicht gezogen. Da dieser Kratzer die Zellschicht zerstört repräsentiert er die Wunde. Nach der Zugabe von EGF erfolgt die mikroskopische Dokumentation der Schließung der Wunde. Nach einem Zeitraum von 0 min, 8 h und 23 h werden Bilder mit einem Lichtmikroskop gemacht. Die Bilder werden anschließend analysiert. Hierbei wird die Breite der Wunde im Verlauf des Heilungsprozesses in Abhängigkeit zu der anfänglichen Wundengröße in Prozent ermittelt. Je kleiner die Wunde, desto fortgeschrittener ist der Heilungsprozess.

mer der Wundheilungsprozess abläuft, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Geschwürbildung in verletztem Gewebe.

Um zu analysieren welche Auswirkungen *H. pylori* auf die Wundheilung ausübt, wurden konfluente AGS Zellen mit dem *H. pylori* Stamm P1 infiziert (Abb. 4.18). Für das Experiment wurde eine MOI von 20 gewählt, da die gesamte Analyse 43 h umfasst und vermieden werden sollte, dass die Zellen durch eine zu starke Infektion apoptotisch werden. Nach 20 h wurde mit einer Pipettenspitze ein Kratzer (Wunde) durch die zusammenhängende Zellschicht gezogen (Abb. 4.18A). Infizierte Zellen und nicht infizierte Zellen wurden nach der Verwundung mit EGF stimuliert und über 23 h beobachtet. Um zu überprüfen, ob der EGF abhängige Wundheilungsprozess in AGS Zellen generell funktioniert, wurde ein Ansatz mit nicht infizierten Zellen nach der Verwundung unstimuliert beobachtet. Null, acht und 23 h nach der Verwundung und Stimulation wurden die Ansätze mit einem Mikroskop fotografiert, um die Breite der Wunde zu analysieren. Die Bilder wurden mit dem Computer-Programmen Photoshop und Excel ausgewertet. Hiermit konnte die jeweilige Größe der Wunde in Abhängigkeit (%) zur ursprünglichen Wundengröße ermittelt werden, die direkt nach der Verwundung vorlag (Abb. 4.18C).

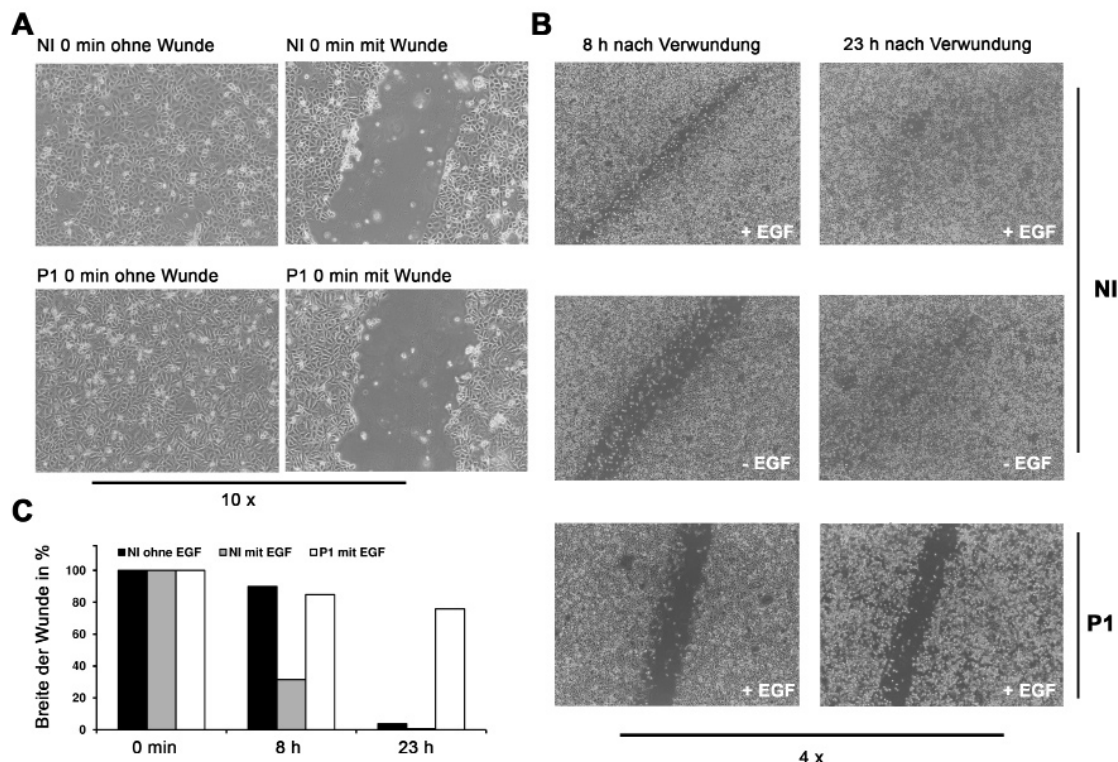


Abb. 4.18: Wundheilungs-Experiment mit *H. pylori* infizierten AGS-Zellen.

Die Zellen wurden 20 h mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 infiziert (MOI 20). Anschließend wurde die zusammenhängende Zellschicht von infizierten und nicht infizierten (NI) Zellen mit einer weißen Pipettenspitze verwundet, mit 100 ng/ml EGF stimuliert und über 23 h beobachtet. Als Kontrolle wurden auch unstimulierte Zellen analysiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Lichtmikroskop. A) Zellschichten von infizierten und nicht infizierten Zellen vor und nach der Verwundung. 10 fache Vergrößerung. B) Wundheilungsprozess acht und 23 h nach der Verwundung und Stimulation. 4 fache Vergrößerung C) Quantifizierung der Wundheilung anhand der Breite des Kratzers. Prozentuale Verkleinerung der Wunde in Relation zur Ursprungsbreite der Wunde in den jeweiligen Ansätzen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass nicht infizierte Zellen, die mit EGF stimuliert wurden, acht Stunden nach der Verwundung einen schnelleren Wundheilungsprozess als unstimu-

lierte Zellen zeigten. Dieses Ergebnis demonstriert, dass die EGF abhängige Zellproliferation, die zu einer Schließung der Wunde führt, in AGS Zellen prinzipiell funktioniert (Abb. 4.18B&C). Nach 23 h hatten sich die Wunden sowohl bei stimulierten als auch bei nicht stimulierten Zellen, die nicht infiziert wurden, wieder zu einer zusammenhängenden Zellschicht geschlossen. Hier konnte demnach ein erfolgreicher Wundheilungsprozess beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei infizierten Zellen weder nach acht noch nach 23 h eine Schließung der Wunde detektiert werden. Demzufolge ist die EGF abhängige Wundheilung in *H. pylori* infizierten Zellen blockiert.

4.3.2. CagA inhibiert die EGF und HB-EGF vermittelte EGFR-Transaktivierung nach verlängerter Infektionsdauer

Im Gegensatz zu der ursprünglichen Annahme, dass *H. pylori* die EGF abhängige Zellproliferation erhöht, kann hier gezeigt werden, dass das Pathogen den EGF abhängigen Wundheilungsprozess inhibiert (Abb. 4.18), obwohl die EGF-Rezeptor Oberflächenexposition auf infizierten Zellen nach 20 h erhöht ist (siehe Ergebnisteil 2). Dies lässt vermuten, dass auch die EGF-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion in *H. pylori* infizierten Zellen nach 20 h Infektion nicht mehr funktioniert. Deshalb sollte nun untersucht werden, welche Auswirkungen eine 20 stündige Infektion auf die EGF-Rezeptor Signalkaskade hat. Da für eine erfolgreiche Induktion des EGF-Rezeptor Signalwegs zuerst der Rezeptor selbst aktiviert werden muss, wurde hier zunächst die Liganden-vermittelte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors überprüft. Hierfür wurden AGS Zellen über einen Zeitraum von 20 h mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 infiziert.

Anschließend wurden die Zellen nach unterschiedlichen Infektionszeitpunkten mit EGF stimuliert und mittels Immunoblot auf EGF-Rezeptor Phosphorylierung überprüft (Abb. 4.19A). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die EGF-Rezeptor Transaktivierung in Zellen, die einer längeren Infektionsperiode (20 h) ausgesetzt waren, stark inhibiert ist. Außerdem kann beobachtet werden, dass auch die Aktivierung EGF abhängiger Signalwege blockiert wird, da die EGF abhängige Phosphorylierung der beteiligten Signalmoleküle in P1 infizierten Zellen nicht mehr zu erkennen ist (Abb. 4.19B; schwarze Pfeile).

Die EGF unabhängige EGF-Rezeptor Transaktivierung, die zu früheren Zeitpunkten der Infektion auftritt, ist hier ebenfalls nicht mehr zu sehen (Ashktorab *et al.*, 2007; Wallasch *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu ist die EGF vermittelte EGF-Rezeptor Phosphorylierung zu früheren Zeitpunkten (0,5 bis 8 h) der Infektion noch klar zu erkennen. Demzufolge kann der EGF-Rezeptor hier noch durch EGF aktiviert werden. Infektionen mit der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA zeigen, dass auch dieser Effekt auf das bakterielle Effektorprotein CagA zurückzuführen ist, da EGF den EGF-Rezeptor in diesen Ansätzen phosphorylieren kann (Abb. 4.19B).

Der EGF-Rezeptor kann durch zahlreiche Liganden wie HB-EGF, TGF α (*transforming growth factor alpha*) und Neureguline aktiviert werden. Aus diesem Grund wurde ebenfalls unter-

sucht, ob die Behandlung infizierter Zellen mit dem Liganden HB-EGF den gleichen Effekt hat (**Abb. 4.19C**), oder ob sich die Beobachtung nur auf EGF-vermittelte Signalprozesse bezieht. Der Immunoblot macht deutlich, dass auch der Ligand HB-EGF den EGF-Rezeptor nicht mehr aktivieren kann. Demzufolge ist die EGF-Rezeptor Inhibierung nicht spezifisch auf EGF vermittelte Signalwege reduziert.

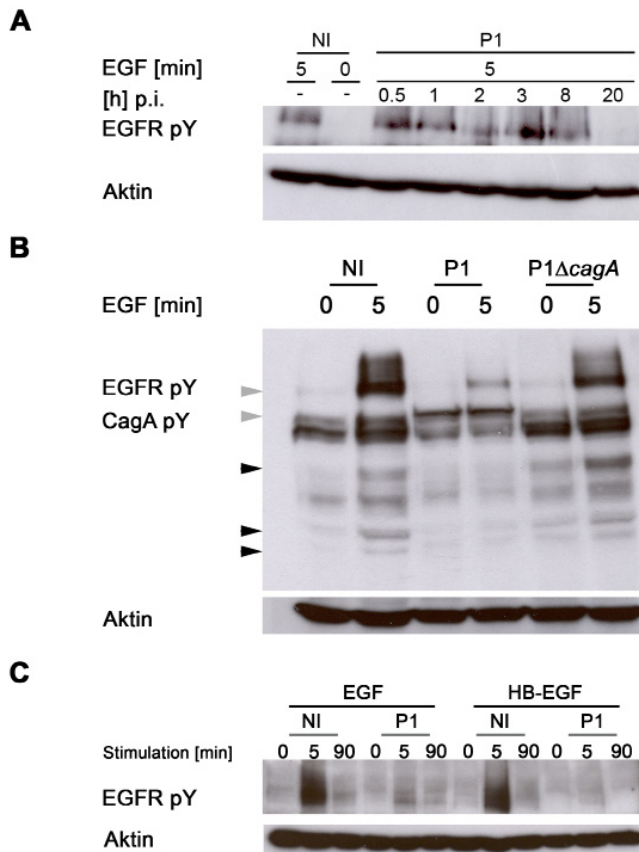


Abb. 4.19: Immunoblot-Analyse der EGF-Rezeptor Transaktivierung in *H. pylori* infizierten AGS-Zellen.

Die Zellen wurden mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 oder P1ΔcagA infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die Proben mit 100 ng/ml EGF oder HB-EGF stimuliert. Die EGFR-Phosphorylierung wurde mit einem anti Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti β-Aktin-Antikörper ermittelt. A) Zeitverlaufsanalyse der EGF abhängigen EGFR-Phosphorylierung nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion. B) 20 h nach Infektion; Phosphotyrosin-Muster infizierter und nicht infizierter (NI) Zellen nach EGF Stimulation. Phosphorylierungen EGF abhängiger Signalmoleküle sind mit schwarzen Pfeilen markiert. C) 20 h nach Infektion; Vergleich der EGFR-Phosphorylierung nach EGF und HB-EGF Stimulation.

Die Daten demonstrieren, dass in Zellen die über 20 h infiziert wurden, nicht nur die Rezeptor-Endozytose gehemmt ist, sondern auch die EGF-Rezeptor Transaktivierung. Die durch den Endozytose-Block herbeigeführte

Verstärkung der EGFR-Oberflächenexposition (**Ergebnisteil 2**) führt demnach nicht zu einer intensivierten EGF-Rezeptor Signalkaskade, was erklärt, warum die EGF abhängige Wundheilung in infizierten Zellen blockiert und nicht erhöht ist.

Die im vorherigen Teil der Arbeit beschriebene verlängerte Phosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y1173 ist in **Abb. 4.19** nicht zu erkennen, da in **Abb. 4.15** (siehe **Seite 62**) ein spezifischer Phospho-Antikörper verwendet wurde. Im Gegensatz dazu wurde für die Analyse der EGF-Rezeptor Transaktivierung ein allgemeiner Phosphotyrosin-Antikörper eingesetzt, der - weniger spezifisch - das gesamte Tyrosin-Phosphorylierungsmuster des EGF-Rezeptors erkennt.

Um zu überprüfen, ob neben Y1173 auch andere Phosphorylierungsstellen des EGF-Rezeptors nicht blockiert sind, wurde das Phosphorylierungsmuster von drei weiteren, wichtigen EGF-Rezeptor Tyrosinen unter Verwendung spezifischer Phospho-Antikörper untersucht (**Abb. 4.20**). Hierbei handelte es sich um EGFR Y845, EGFR Y992 und EGFR Y1045. Für das Experiment wurden AGS Zellen 20 h infiziert und mittels Immunoblot analysiert.

Im Gegensatz zum EGF-Rezeptor Tyrosinrest Y1173 zeigte sich in diesem Datensatz eine Inhibierung der Phosphorylierung aller drei untersuchten Aminosäuren. Das Phosphorylierungs-

muster der drei spezifischen EGF-Rezeptor Tyrosine zeigt demnach das gleiche Muster wie die Ergebnisse aus **Abb. 4.19**. Dies verdeutlicht, dass die EGF-Rezeptor Transaktivierung in infizierten Zellen inhibiert wird. Nur die Aminosäureposition Y1173 scheint davon selektiv nicht betroffen zu sein.

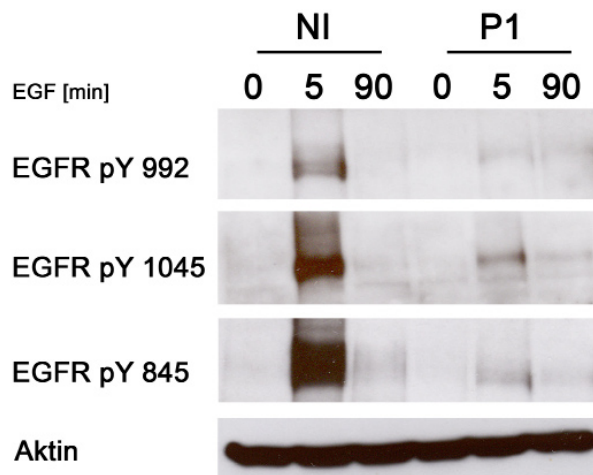


Abb. 4.20: Immunoblot-Analyse der EGF-Rezeptor Transaktivierung an den Tyrosinresten EGFR Y845, EGFR Y992 und EGFR Y1045 in *H. pylori* infizierten AGS-Zellen.

Die Zellen wurden 20 h mit P1 infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die Proben mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die EGFR-Phosphorylierung wurde mit spezifischen anti EGFR-Phosphotyrosin Antikörpern überprüft. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti β -Aktin-Antikörper ermittelt.

4.3.3. Die inhibierte Rezeptor-Transaktivierung richtet sich gezielt gegen den EGF-Rezeptor

Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob sich die *H. pylori* induzierte Hemmung der Rezeptor-Transaktivierung auf mehrere Rezeptor-Tyrosinkinasen bezieht oder ob es sich hierbei um einen spezifischen Prozess handelt. Hierfür wurde die Transaktivierung des EGF-Rezeptors mit der des c-Met-Rezeptors verglichen. c-Met wird durch den Liganden HGF phosphoryliert und verändert im Gegensatz zum EGF-Rezeptor seine Oberflächen-Expression während der Infektion nicht (**Abb. 4.7**; **S. 53**). Immunopräzipitationen des EGF- und c-Met-Rezeptors aus Zellen, die 20 h mit P1 oder dem isogenen Deletions-Stamm P1 Δ cagA infiziert wurden, zeigen, dass c-Met im Gegensatz zum EGF-Rezeptor Liganden-abhängig aktiviert werden kann (**Abb. 4.21A&B**).¹

Die Daten unterstützen demnach die Hypothese, dass die *H. pylori* induzierte Rezeptor-Inhibierung ein zielgerichteter Prozess zu sein scheint, der sich vorwiegend auf den EGF-Rezeptor bezieht.

¹ Das Experiment in Abb. 4.21B entstand in Kooperation mit Sina Bartfeld, Doktorandin am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in der Abteilung Molekulare Biologie

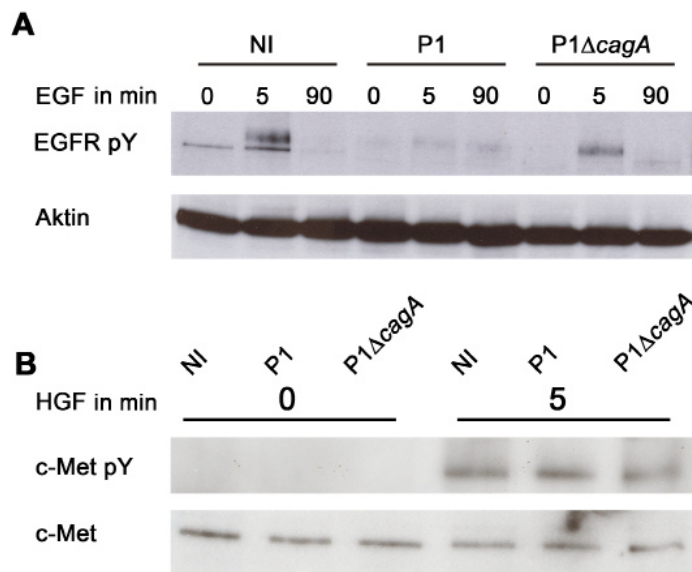


Abb. 4.21: Immunopräzipitation des EGF- und c-Met-Rezeptors von *H. pylori* infizierten AGS-Zellen.

Die Zellen wurden 20 h mit P1 oder P1 Δ cagA infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die Proben mit 100 ng/ml EGF oder HGF stimuliert. Danach wurden die Rezeptoren mit entsprechenden Antikörpern präzipitiert. Die EGFR- und c-Met-Phosphorylierung wurde mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper überprüft. A) EGFR-Präzipitation mit anti-EGFR-Antikörper; Die Ladekontrolle wurde mit einem anti- β -Aktin-Antikörper unter dem Einsatz des verwendeten Zelllysats ermittelt. B) c-Met-Präzipitation mit anti-c-Met-Antikörper; Die Ladekontrolle wurde mit einem anti-c-Met-Antikörper ermittelt.

4.3.4. Die inhibierte EGF-Rezeptor Transaktivierung hemmt die EGF abhängige Formation und Aktivierung des SHC/Grb2/EGFR-Komplexes

Nach der EGF induzierten Dimerisierung und Transaktivierung des EGF-Rezeptors werden die Adapterproteine SHC und Grb2 rekrutiert und bilden zusammen mit dem EGF-Rezeptor einen Proteinkomplex, der die Internalisierung des Rezeptors einleitet (**Abb. 4.22**).

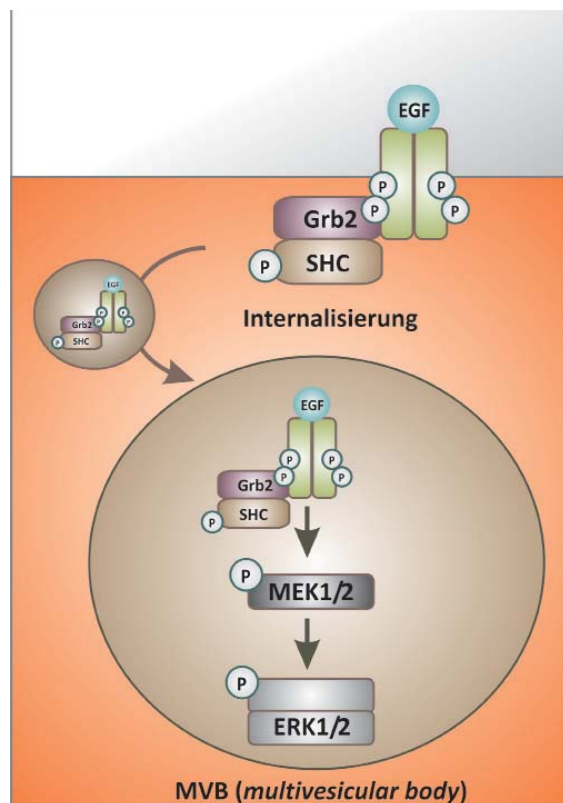


Abb. 4.22: Modell der vesikulären Signalkaskade des EGFR/SHC/Grb2-Komplexes.

Nach der Bindung von EGF an den EGFR kommt es zur Rezeptordimerisierung. Die Dimerisierung induziert die Phosphorylierung der zyttoplasmatischen Rezeptordomäne (Transaktivierung). Es kommt zu der Rekrutierung und Bindung der Adapterproteine Grb2 und SHC. SHC wird phosphoryliert und zusammen mit dem EGF-Rezeptor und Grb2 endosomal internalisiert. Durch Vesikelfusion kommt es zur Bildung sog. *multivesicular bodies* (MVB), die u.a. Komponenten der ERK1/2 Signalkaskade enthalten. In diesen Vesikeln werden sowohl MEK1/2 und ERK1/2 aktiviert.

Die EGFR/SHC/Grb2-haltigen Vesikel verschmelzen zu sog. multivesicular bodies (MVB) und aktivieren dort die MEK/ERK-Signalkaskade, die ein wichtiger Bestandteil zahlreicher zellulärer Signaltransduktionswege ist (Burke *et al.*, 2001; Oksvold *et al.*, 2001). Da der EGF-Rezeptor in Zellen, die 20 h mit *H. pylori* infiziert wurden, weder endozytiert noch vollständig transaktiviert wird, sollte untersucht werden, ob die

EGF vermittelte Komplexbildung von EGFR/SHC/Grb2 und die Phosphorylierung (Aktivierung) von SHC dennoch induziert werden kann. Für diesen Versuch wurde sowohl Grb2 als

auch SHC aus infizierten und EGF-stimulierten Zellen immunopräzipitiert und mittels Immunoblotanalyse auf Phosphorylierung und Komplexbildung überprüft (**Abb. 4.23A**).

In nicht infizierten Zellen konnte unter EGF-Zugabe deutlich ein Komplex aus EGFR/SHC/Grb2 immunopräzipitiert werden, in dem sowohl der EGF-Rezeptor als auch die drei SHC-Isoformen (p66, p52, p46) phosphoryliert vorliegen. Dies war bei infizierten Ansätzen nicht möglich. Hier war sowohl die Komplexbildung als auch die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und der SHC Isoformen p66, p52 und p46 blockiert. Auch unter Verwendung eines spezifischen SHC Phospho-Antikörpers, der die Phosphorylierung der Tyrosine SHC Y239/240 erkennt, zeigte sich, dass die EGF vermittelte Phosphorylierung aller drei SHC-Isoformen unterdrückt wird (**Abb. 4.23B**). In diesem Experiment wurden auch Infektionen mit der Mutante P1 Δ cagA durchgeführt. Die Inhibierung der SHC-Phosphorylierung war in diesen Ansätzen nicht unterdrückt, was darauf schließen lässt, dass die Inhibierung der SHC-Phosphorylierung und – Komplexbildung CagA abhängig ist (**Abb. 4.23B**).

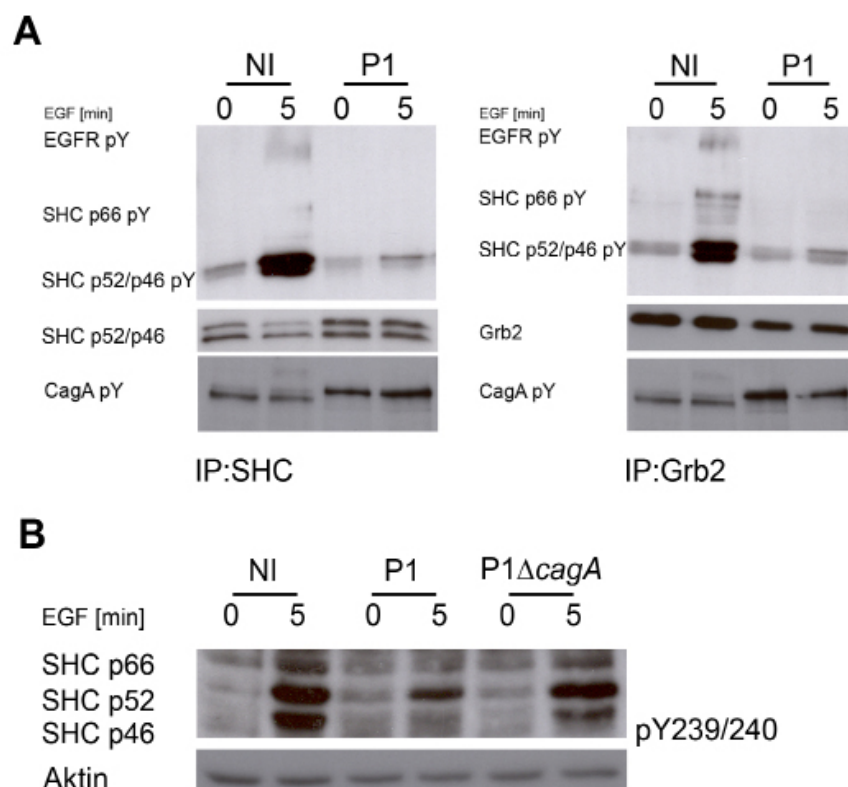


Abb. 4.23: Immunopräzipitation von SHC und Grb2 und Phosphorylierung von SHC in *H. pylori* infizierten Zellen.

AGS Zellen wurden 20 h mit P1 oder P1 Δ cagA (MOI 100) infiziert. Nicht infizierte (NI) und infizierte Zellen wurden anschließend mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Phosphorylierungsnachweis der Präzipitate und Lysate (CagA pY) erfolgte mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper. (A) links: Immunopräzipitation mit einem anti SHC-Antikörper; rechts: Immunopräzipitation mit einem anti Grb2-Antikörper; B) Phosphorylierungsmuster der SHC-Isoformen mit SHC pY239/240 Antikörper. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti β -Aktin-Antikörper ermittelt.

Das Ausmaß der Inhibierung ist in Bezug auf die unterschiedlichen SHC Isotypen jedoch unterschiedlich stark. Während die Phosphorylierung der Isoformen SHC p66 und SHC p46 in Wildtyp infizierten Zellen nicht mehr zu detektieren ist, ist die Phosphorylierung der Isoform SHC p52 noch klar zu erkennen. Hier scheint die Signalkaskade nicht vollständig unterbro-

chen zu werden. Zusammengefasst demonstrieren die Daten, dass CagA nach 20 h Infektion durch eine Hemmung der EGF-Rezeptor Transaktivierung die EGF-Rezeptor abhängige SHC/Grb2/EGFR-Signalkaskade blockiert. Dies lässt auch vermuten, dass die ERK1/2 Aktivierung ebenfalls nicht mehr induziert werden kann. Die Ergebnisse aus **Abb. 4.23B** zeigen allerdings auch, dass die Wirkung von EGF nicht vollständig inhibiert ist.

4.3.5. In *H. pylori* infizierten Zellen wird ERK1/2 Signalkaskade trotz der inhibierten EGFR/SHC/Grb2-Komplexbildung aktiviert

Aus der Literatur ist bekannt, dass ERK1/2 in der initialen Phase der *H. pylori* Infektion (15–30 min) aktiviert wird (Keates *et al.*, 1999). Welche Auswirkungen eine Infektion von 20 h auf ERK1/2 hat wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Da beobachtet wurde, dass sowohl die EGF-Rezeptor Transaktivierung als auch die EGFR/SHC/Grb2-Komplexbildung inhibiert ist, liegt es nahe, dass die ERK1/2 Aktivierung nach 20 h Infektion ebenfalls vollständig blockiert ist. Die ERK1/2 Signalkaskade kontrolliert zentrale zelluläre Prozesse wie Inflammation und Zellproliferation und sollte deshalb hier überprüft werden. Hierfür wurden die Zellen unterschiedlich lange infiziert und dann mittels Immunoblotanalyse unter Verwendung eines spezifischen ERK1/2 Phospho-Antikörpers untersucht (**Abb. 4.24A**). Hierbei stellte sich heraus, dass Zellen, die 30 min infiziert wurden, eine starke ERK1/2 Phosphorylierung zeigten, die nach 90 min nicht mehr detektiert werden konnte. Zellen die 20 h infiziert wurden, zeigten hingegen erneut eine starke Phosphorylierung von ERK1/2. Die *H. pylori* induzierte Aktivierung von ERK1/2 ist demzufolge in Zellen, die einer verlängerten Infektion unterlagen, überraschenderweise nicht blockiert. Das Bakterium induziert sogar eine starke Basalaktivierung, ohne dass die Zellen mit EGF stimuliert werden müssen.¹

Das Ergebnis demonstriert zwar, dass ERK1/2 aktiviert werden kann, liefert aber keine Aussage darüber, ob die EGF abhängige ERK1/2 Aktivierung noch funktionstüchtig ist. Die beobachtete Aktivierung könnte hier durch einen anderen Signaltransduktionsweg initiiert werden. Deshalb sollte ebenfalls untersucht werden, ob ERK1/2 neben der *H. pylori* induzierten Grundaktivierung zusätzlich EGF abhängig stimuliert werden kann. Hierfür wurden Zellen infiziert und 20 h nach der Infektion für 5 min mit EGF stimuliert (**Abb. 4.24B**). Die Phosphorylierung ist zwar schwächer als in nicht infizierten Zellen, aber immer noch klar detektierbar. EGF kann demnach trotz des inhibierten EGF-Rezeptors die Kinasen ERK1/2 aktivieren, was darauf schließen lässt, dass ERK1/2 in infizierten Zellen auf unterschiedlichen Wegen aktiviert werden kann. Erstens kommt es zu einer *H. pylori* vermittelten, EGF unabhängigen Basalaktivierung von ERK1/2 (**Abb. 4.24A**). Zweitens kann ERK1/2 trotz des inhibierten EGF-Rezeptors weiterhin durch EGF-Stimulation aktiviert werden (**Abb. 4.24B**). Das bekräftigt die Ergebnisse, die bei der Untersuchung der phosphorylierten SHC-Isoformen gewonnen wurden (**Abb. 4.23B**) und deutet nochmals darauf hin, dass die EGF abhängige Signalkaskade in *H. pylori* infizierten Zellen trotz der Inhibierung des EGF-Rezeptors nicht vollständig blo-

¹ Abb. 3.24A entstand in Kooperation mit Carsten Holland, Doktorand am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in der Abteilung Molekulare Biologie

ckiert sein kann. Der EGF abhängige Effekt könnte durch einen anderen, noch unbekannten Rezeptors ausgelöst werden, der EGF bindet.

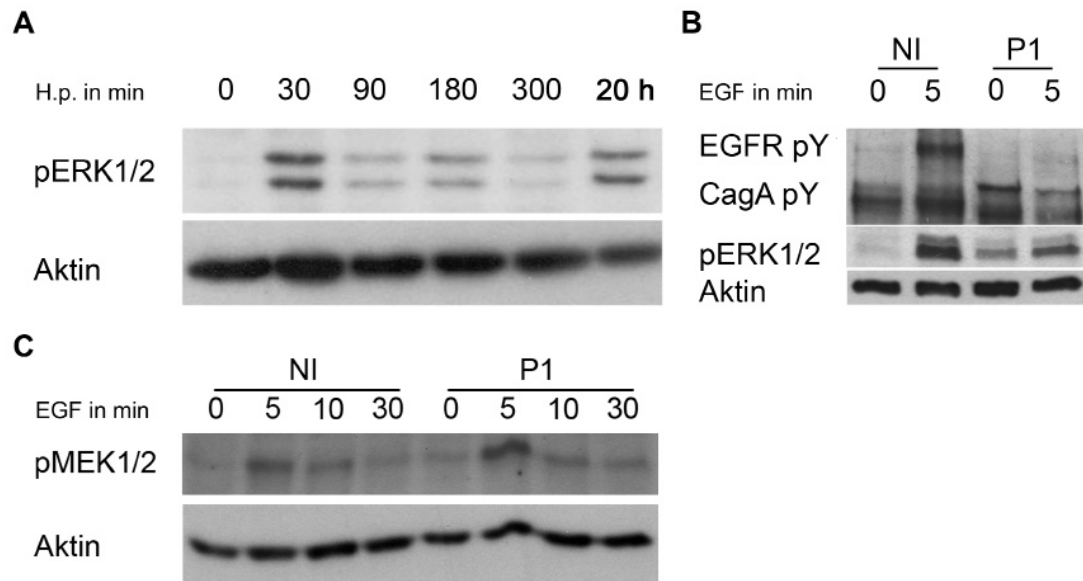


Abb. 4.24: Immunoblotanalyse der Phosphorylierung von ERK1/2 und Mek1/2 in *H. pylori* infizierten AGS-Zellen. AGS Zellen wurden mit P1 (MOI 100) infiziert. Ladekontrolle: anti β -Aktin-Antikörper. A) Zelllysate wurden nach der Infektion mit einem pERK1/2 Antikörper analysiert. B, C) Nicht infizierte (NI) und infizierte (P1) Zellen wurden jeweils 20 h nach der Infektion mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die EGF-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 (B) und MEK1/2 (C) wurde mit einem pERK1/2-Antikörper bzw. pMEK1/2 Antikörper bestimmt. Die Ladekontrollen wurde mit einem anti β -Aktin-Antikörper ermittelt.

Nach EGF Stimulation phosphoryliert der MEK1/2 Kinase-Komplex ERK1/2 in den MVBs (siehe [Abb. 4.22](#)). Um zu überprüfen, ob die EGF abhängige ERK1/2 Aktivierung in infizierten Zellen durch den Kinase-Komplex MEK1/2 eingeleitet wird, obwohl die EGFR/SHC/Grb2 Komplexbildung inhibiert ist, wurden infizierte und nicht infizierte Zellen 0, 5, 10 und 30 mit EGF stimuliert und mittels Immunoblot analysiert ([Abb. 4.24C](#)). Das Ergebnis zeigt deutlich, dass MEK1/2 in infizierten Zellen tatsächlich ebenfalls EGF abhängig aktiviert werden kann. Demzufolge ist zwar die EGFR/SHC/Grb2 Komplexbildung inhibiert, die EGF induzierte MEK1/2 Signalkasade funktioniert jedoch weiterhin und muss daher über einen anderen Weg eingeleitet werden.

Um die Ergebnisse aus diesem Abschnitt in einem schnellen Überblick nochmals erfassen zu können, ist das daraus konzipierte Modell nochmals in [Abb. 4.25](#) zusammengefasst.

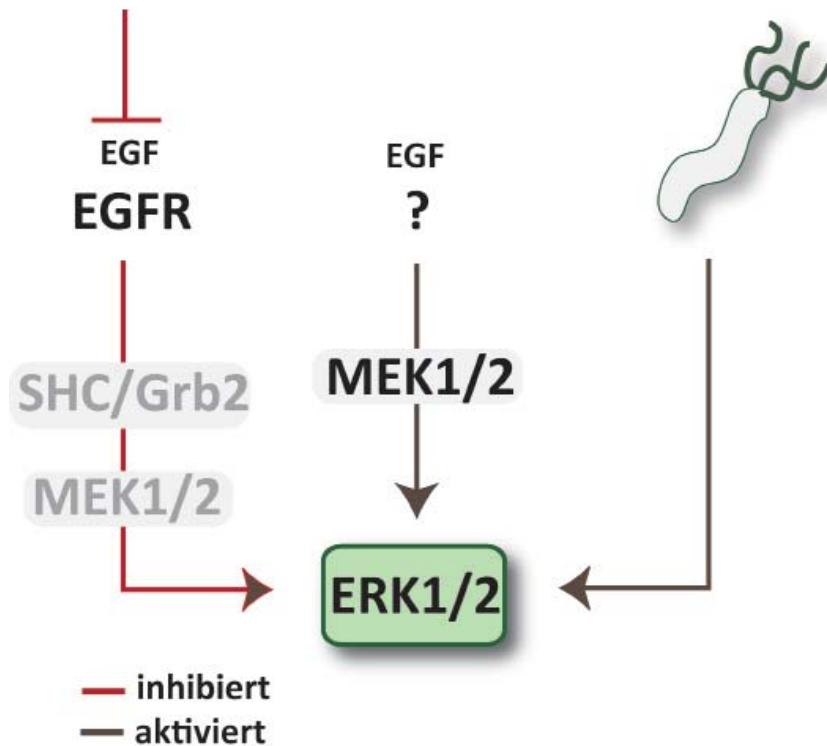


Abb. 4.25: Modell zur ERK1/2 Aktivierung in *H. pylori* infizierten Zellen nach 20 h Infektion.

In *H. pylori* infizierten Zellen existieren nach 20 h Infektion unterschiedliche Aktivierungsmöglichkeiten für ERK1/2. Einerseits aktiviert das Bakterium die MAP-Kinasen unabhängig davon, ob die Zellen mit Wachstumsfaktoren stimuliert wurden oder nicht. Andererseits kann ERK1/2 EGF abhängig aktiviert werden, obwohl die EGF-Rezeptor Signalkaskade blockiert ist. Dieser Weg verläuft über die Kinasen MEK1/2. Welcher Faktor (Rezeptor?) diese Signalkaskade induziert ist noch unklar.

Um zu untersuchen, ob die EGF abhängige bzw. EGF unabhängige Aktivierung von ERK1/2 in *H. pylori* infizierten Zellen auch zu einer verstärkten Transkription von ERK1/2 abhängigen Genen führt, wurden mittels *Real-Time* PCR drei ERK1/2 abhängige Gene auf ihre mRNA-Expression überprüft: IL-8, Fos und Egr1 (Abb. 4.26). In nicht infizierten Zellen kam es nach 30 min EGF-Stimulation zu einer starken Induktion aller drei Gene, die danach wieder abnahm (Abb. 4.26A). In infizierten Zellen zeigte sich dahingegen ein völlig anderes Expressionsmuster. Hier war die Genexpression von IL-8 bereits durch die Infektion induziert. Außerdem stieg sie im Vergleich zu nicht infizierten Zellen auch nach 90 min EGF-Stimulation weiterhin stark an (Abb. 4.26B). Auch die Expression von Fos und Egr1 war in infizierten Zellen bereits EGF abhängig induziert, jedoch in geringerem Ausmaß als IL-8. Im Gegensatz zu IL-8 fiel die Expression dieser beiden Gene jedoch nach 60 min EGF-Stimulation wieder ab.

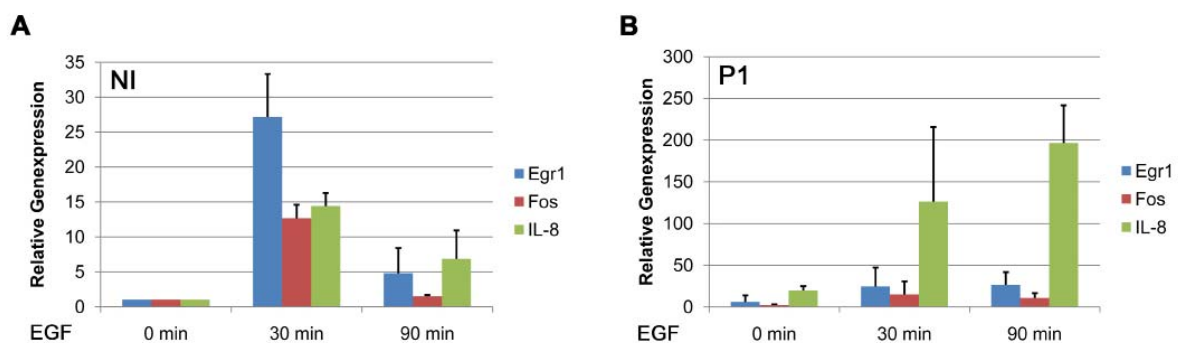


Abb.4.26: Real-Time PCR Analyse der Expression von Egr1, Fos und IL-8 in *H. pylori* infizierten Zellen.

AGS Zellen wurden 20 h mit P1 infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Nach der RNA-Isolation wurde die Genexpression mittels *Real time* PCR bestimmt. Als Normalisierungswert wurde die Expression von GAPDH verwendet. Die Standardabweichung wurde anhand von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. A) Relative Genexpression in nicht infizierten (NI), stimulierten Zellen in Relation zu nicht infizierten, unstimulierten Zellen. B) Relative Genexpression von infizierten, stimulierten Zellen in Relation zur Genexpression nichtstimulierter, nicht infizierter Zellen.

Die Real-Time PCR Ergebnisse veranschaulichen, dass die ERK1/2 induzierte Genexpression in infizierten Zellen mit dem vorher beobachteten Aktivierungszustand des Kinasekomplexes übereinstimmt. Auch hier zeigt sich sowohl eine EGF abhängige als auch eine EGF unabhängige Induktion (**Abb. 4.24**). *H. pylori* blockiert demnach die EGFR/SHC/Grb2 vermittelte Signalkaskade, ohne jedoch den EGF abhängigen ERK1/2 Signalweg zu hemmen. Den Expressionsdaten zur Folge ist die EGF induzierte Signaltransduktion, die zu einer EGF-Rezeptor unabhängigen Aktivierung von ERK1/2 führt, in Richtung IL-8 Expression sogar potenziert. Sie bricht auch nach 90 min EGF Stimulation nicht ab.

4.3.6. Der EGF-Rezeptor ist weder an der EGF abhängigen noch an der EGF unabhängigen Aktivierung von ERK1/2 in infizierten Zellen beteiligt

Die EGF abhängige Aktivierung von ERK1/2 in infizierten Zellen deutet darauf hin, dass der EGF induzierte Signaltransduktionsweg trotz der Inhibierung des EGF-Rezeptors nach wie vor funktioniert. Dies könnte damit zusammen hängen, dass diese Signalkaskade über das nach wie vor phosphorylierbare EGF-Rezeptor Tyrosin Y1173 verläuft (**siehe Ergebnisteil 2; Abb. 4.15**). Es könnten aber auch andere EGF-Rezeptor Tyrosine eine Rolle spielen, die hier noch nicht einzeln überprüft wurden. Um zu klären, ob die EGF abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den EGF-Rezeptor induziert wird, wurden drei stabile AGS Zelllinien konstruiert (EGFR-10, 11, 12) die keinen EGF-Rezeptor mehr exprimieren. Hierfür wurden Lentiviren eingesetzt, deren Genom für spezifische shRNA Sequenzen kodiert, die gegen den EGF-Rezeptor gerichtet sind. Die Expression der shRNA Sequenzen führt nach Insertion des lentiviralen Genoms in das eukaryotische Genom, zu einer Hemmung der EGF-Rezeptor Synthese. Die verschiedenen Zelllinien unterscheiden sich in den shRNA Sequenzen der inserierten Lentiviren. Als Kontrollen wurden Zelllinien mit Lentiviren hergestellt, die keine shRNA Sequenz (AGS shLeer) oder eine shRNA Sequenz gegen Luciferase (AGS shLuci) exprimieren. Die Proteinmenge des EGF-Rezeptors in diesen Zellen wurde mittels Immunoblot überprüft (**Abb. 4.27A**). In allen drei EGF-Rezeptor Zelllinien konnte eine fast vollständige Inhibierung der EGF-Rezeptor Proteinsynthese erzielt werden.

Nun sollte überprüft werden, ob ERK1/2 trotz des fehlenden EGF-Rezeptors in infizierten Zellen nach wie vor aktiviert wird. Hierfür wurde die Zelllinie EGFR-10 und die Kontrollzelllinie AGS shLuci 20 h mit dem *H. pylori* Stamm P1 infiziert und anschließend für 5 min mit EGF stimuliert. Der Aktivierungsstatus von ERK1/2 wurde schließlich mittels Immunoblot analysiert (**Abb. 4.27B**). Beide Zelllinien zeigten nach der Infektion eine leichte EGF unabhängige Basalaktivierung von ERK1/2. Es war aber auch eine EGF abhängige ERK1/2 Aktivierung zu sehen. Diese war in beiden Zelllinien gleich stark. Das Ergebnis beweist demnach, dass weder die EGF abhängige noch EGF unabhängige Aktivierung von ERK1/2 EGF-Rezeptor abhängig ist.

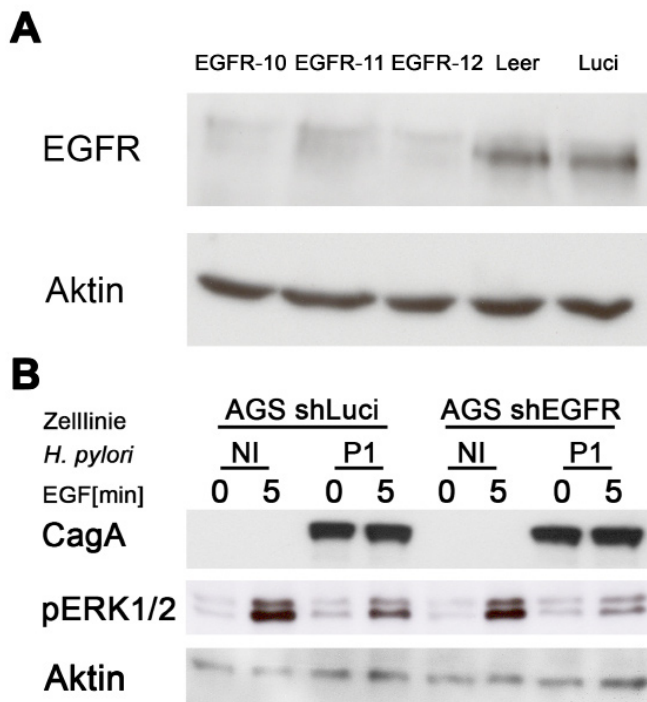


Abb. 4.27: Immunoblotanalyse der EGF abhängigen und EGF unabhängigen ERK1/2 Aktivierung in *H. pylori* infizierten EGFR shRNA Zellen.

A) Analyse der EGFR Proteinexpression in stabilen AGS EGFR shRNA Zelllinien und entsprechenden Kontrollen. Die AGS-Zelllinien EGFR-10, EGFR-11 und EGFR-12 wurden mit Lentiviren hergestellt, die komplementäre EGFR shRNA Sequenzen tragen. AGS Leer und AGS Luci sind Kontrollen, die entweder mit Lentiviren hergestellt wurden, die keine shRNA Sequenz oder eine shRNA Sequenz gegen Luciferase tragen. Die Analyse erfolgte anhand eines anti EGFR-Antikörpers. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti β -Aktin-Antikörper ermittelt. B) Die Zelllinie EGFR-10 (AGS shEGFR) und die Kontrollzelllinie AGS shLuci wurden 20 h mit P1 infiziert (MOI 100) und danach 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Proben wurden anschließend mit einem anti CagA-Antikörper, einem anti pERK1/2-Antikörper und einem anti β -Aktin-Antikörper analysiert. Letzterer wurde für die Ladekontrolle eingesetzt.

4.3.7. Neben der ERK1/2 Kaskade werden auch andere EGF-Rezeptor Signalwege selektiv durch *H. pylori* manipuliert

Betrachtet man die bisher beschriebenen Resultate, so führen *H. pylori* Infektionen nach 20 h zu einer Inhibierung der EGF-Rezeptor Aktivierbarkeit (Abb. 4.19) und blockieren demzufolge auch die Komplexbildung von EGFR/SHC/Grb2 (Abb. 4.23), die eine Voraussetzung für die EGF abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 ist. Dennoch kann sowohl eine EGF abhängige als auch EGF unabhängige Aktivierung von ERK1/2 detektiert werden (Abb. 4.24), wobei letztere durch *H. pylori* direkt induziert wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass beide Aktivierungsvorgänge nicht durch den EGF-Rezeptor vermittelt werden (Abb. 4.27). Diese Ergebnisse sprechen nicht nur für die Existenz eines weiteren EGF-bindenden Rezeptors, der während einer *H. pylori* Infektion nicht inhibiert wird, sondern demonstrieren auch, dass Signaltransduktionskaskaden, die normalerweise durch den EGF-Rezeptor gesteuert werden, trotz der selektiven Rezeptor-Inhibierung aktiv bzw. aktivierbar bleiben. Demzufolge stellt sich die Frage, ob die *H. pylori* induzierte Inhibierung der EGF-Rezeptor Transaktivierung überhaupt Auswirkungen auf EGF-Rezeptor gesteuerte Signalwege hat. Um diese Frage zu beantworten, sollten mit folgenden Experimenten weitere EGF-Rezeptor vermittelte Signaltransduktionswege untersucht werden, zu denen vor allem die EGF abhängige Aktivierung der Phosphoinositid-Phospholipase C gamma (PLC γ) und die Aktivierung der Proteinkinase B α (PKB; AKT) zu zählen sind (siehe Abb. 4.28).

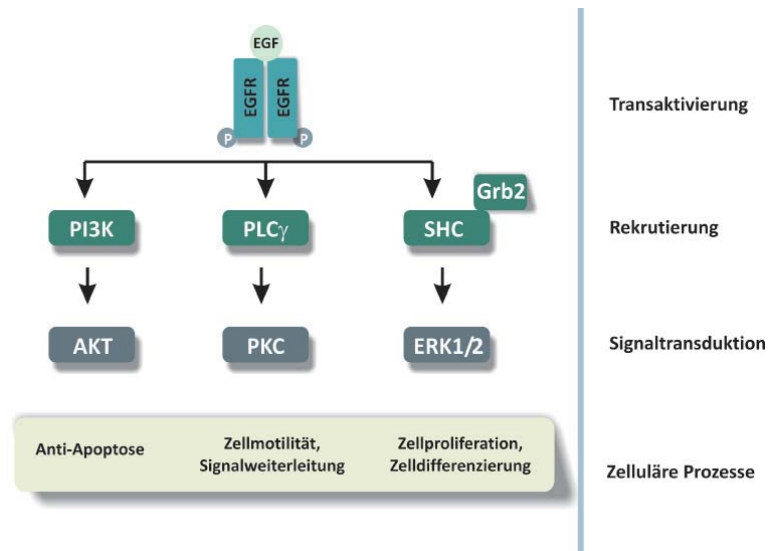


Abb. 4.28: Modell EGF-Rezeptor abhängiger Signaltransduktionswege.

Nach der Bindung von EGF dimerisiert der EGF-Rezeptor und wird durch Phosphorylierung an seiner zytoplasmatischen Domäne transaktiviert. Es kommt zur Rekrutierung bestimmter Signalmoleküle, zu denen sowohl Kinasen wie die PI3K als auch Adaptorproteine wie SHC und Grb2 gehören. Auch die Phospholipase PLC γ wird rekrutiert. Diese Moleküle initiieren unterschiedliche Signalkaskaden. PI3K aktiviert die Kinase AKT, die wiederum zahlreiche weitere Substrate phosphoryliert. Die Funktion dieses Signalwegs liegt vor allem in der Einleitung anti-apoptotischer Prozesse. PLC γ aktiviert die Kinase PKC. Diese Signalmoleküle kontrollieren so-

wohl die Signalweiterleitung ins Zellinnere als auch die Zellmotilität. Die Aktivierung von ERK1/2 verläuft über SHC und Grb2. Durch die Aktivierung dieses Signalwegs kommt es zu einer erhöhten Zellproliferation. Auch die Zelldifferenzierung wird durch diesen Weg kontrolliert.

Während PLC γ vor allem die Weiterleitung von Signalen von der Zellmembran ins Zytosol kontrolliert, steuert AKT anti-apoptotische Prozesse und die Neusynthese von Proteinen.

Für die Analyse wurden AGS Zellen 20 h mit *H. pylori* infiziert, anschließend für 5 min mit EGF stimuliert und mittels Immunoblot auf den Aktivierungszustand und die Aktivierbarkeit der oben genannten Signalmoleküle untersucht (Abb. 4.29). Hierfür wurden spezifische Phospho-Antikörper für PLC γ und AKT eingesetzt. Auch die Phosphorylierung von AKT Substraten wurde anhand eines spezifischen Antikörper analysiert, der den Aktivierungszustand von AKT abhängigen Signalmolekülen detektiert. Da der *H. pylori* vermittelte Eingriff in die EGF-Rezeptor Aktivierung von dem Effektor CagA abhängt, sollte der Einfluss von CagA in diese Vorgänge ebenfalls überprüft werden. Deshalb wurden die Zellen zusätzlich mit der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA infiziert.

Die Ergebnisse zeigen wie selektiv *H. pylori* die Aktivierung EGF-Rezeptor abhängiger Signalmoleküle beeinflusst und kontrolliert. Es ist klar zu erkennen, dass bestimmte Signalmoleküle in *H. pylori* infizierten Zellen tatsächlich inhibiert werden. Hierzu gehört die Kinase AKT, welche an zwei Aminosäurepositionen (Serin 473; Threonin 308) phosphoryliert werden muss, um vollständig aktiv zu sein. In nicht infizierten Zellen ist AKT auch in der unstimulierten Probe an beiden Aminosäuren phosphoryliert (Abb. 4.29A). Dies ist charakteristisch für Krebszellen wie der hier verwendeten humanen Adenokarzinom-Zelllinie AGS. Trotz der starken Hintergrundaktivierung lässt sich die Phosphorylierung beider Aminosäuren durch EGF Stimulation nochmals erhöhen. In P1 infizierten Zellen hingegen ist nicht nur die Basalaktivierung von AKT inhibiert, sondern auch die EGF abhängige Phosphorylierung. Hierbei lässt sich ein leichter Einfluss des bakteriellen Effektors CagA erkennen, da sich die AKT Phosphorylierung in Infektionen mit der isogenen Deletionsmutante P1 Δ cagA im Vergleich zu P1 infizierten Zellen wieder erhöht. Die Aktivierung von AKT ist demnach in P1 infizierten Zellen sowohl über den EGF induzierten Signalweg als auch in Bezug auf die krebszelltypische Ba-

salaktivierung inhibiert.

Betrachtet man die Aktivierungszustände der AKT abhängigen Substrate ergibt sich ein differenziertes Bild (Abb. 4.29B). Deutlich wird, dass das Pathogen sowohl die Aktivierung von Substraten inhibiert, die in nicht infizierten Zellen EGF unabhängig induziert werden (grüne und pinke Pfeile), aber auch Substrate inhibiert die EGF abhängig aktiviert werden (schwarzer Pfeil). Diese Veränderungen werden teilweise durch CagA gesteuert (pinke Pfeile), können aber auch CagA unabhängig verlaufen (schwarze und grüne Pfeile). Neben den inhibitorischen Effekten erkennt man aber auch aktivierte Substrate. Genauso wie bei der Aktivierung von ERK1/2 kommt es hier zu einer EGF abhängigen als auch EGF unabhängigen Aktivierung von bestimmten AKT Substratmolekülen (weiße Pfeile). Dies unterstreicht nochmals, dass die EGF vermittelte Signaltransduktion trotz des inhibierten EGF-Rezeptors in bestimmten Richtungen noch funktionstüchtig ist. Infektionen mit *H. pylori* führen demnach zu einer selektiven Hemmung und Aktivierung EGF-Rezeptor abhängiger Signalkaskaden. Außerdem wird deutlich, dass zahlreiche AKT-Substrate nicht durch eine EGF abhängige Aktivierung von AKT selbst induziert werden, da diese hier gehemmt ist (grüne Pfeile).

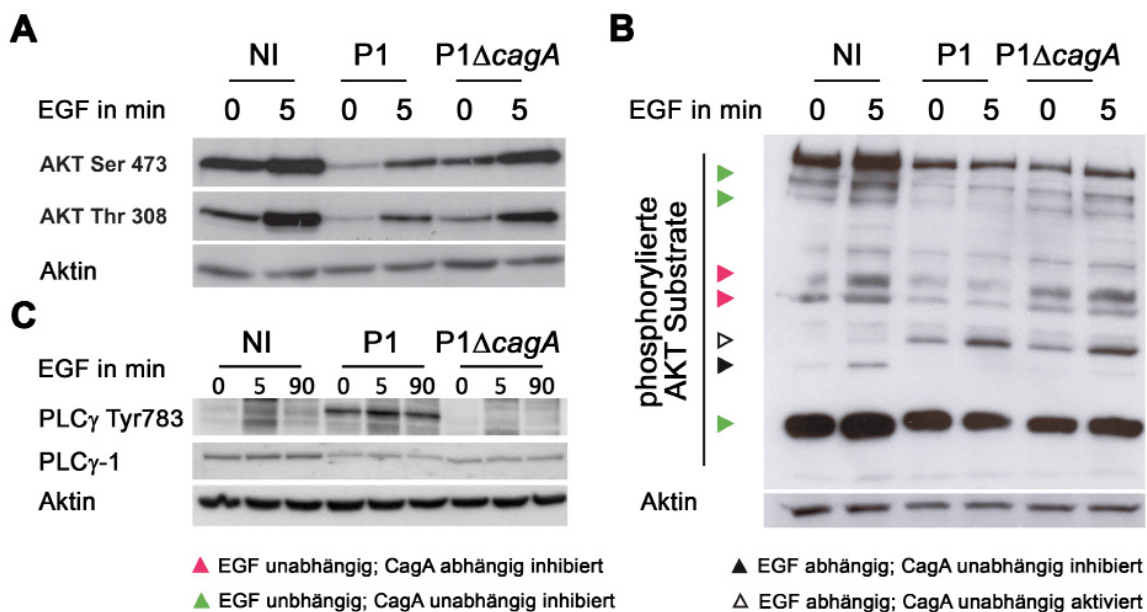


Abb. 4.29: Immunoblotanalyse der EGF abhängigen und EGF unabhängigen Aktivierung von EGF-Rezeptor induzierten Signalmolekülen in *H. pylori* infizierten Zellen.

AGS Zellen wurden 20 h mit dem *H. pylori* Stamm P1 oder der isogenen Deletionsmutante P1ΔcagA infiziert (MOI 100). Anschließend wurden die Zellen 0 und 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert und mittels Immunoblot analysiert. Die Ladekontrollen wurden in allen Ansätzen mit einem anti β-Aktin-Antikörper ermittelt. A) Immunoblotanalyse der infizierten (P1 und P1ΔcagA) und nicht infizierten (NI) Zellen mit den phosphospezifischen AKT Antikörpern anti AKT Ser 473 und AKT Thr 308. B) Immunoblotanalyse der Zelllysate mit einem Antikörper, der phosphorylierte AKT Substrate erkennt. Pinke Pfeile markieren Substrate, die in nicht infizierten Zellen EGF unabhängig aktiviert werden, in infizierten Zellen jedoch CagA abhängig inhibiert werden. Grüne Pfeile markieren Substrate, die in nicht infizierten Zellen EGF unabhängig aktiviert werden und in infizierten Zellen CagA unabhängig inhibiert werden. Schwarze Pfeile markieren Substrate, die in nicht infizierten Zellen EGF abhängig aktiviert werden, in infizierten Zellen jedoch CagA unabhängig inhibiert werden. Weiße Pfeile markieren Substrate, die in nicht infizierten Zellen EGF abhängig aktiviert werden und in infizierten Zellen CagA unabhängig aktiviert sind. C) Immunoblotanalyse der Zellen anhand eines phosphospezifischen PLCγ Antikörpers (anti PLCγ Tyr783; oberer Bildabschnitt) und eines allgemeinen PLCγ Antikörpers (mittlerer Bildabschnitt). In diesem Ansatz wurden die Zellen 0, 5 und 90 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert.

Die Untersuchung der PLC γ Aktivierung lieferte wiederum ein völlig anderes Aktivierungsmuster (**Abb. 4.29C**). Hier zeigte sich in P1 infizierten Zellen eine konstante Aktivierung der Lipase, deren Aktivierungszustand eindeutig von CagA abhängt. EGF spielt hierbei keine Rolle, da EGF stimulierte Zellen keine erhöhte Phosphorylierung von PLC γ zeigten.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Analyse, dass *H. pylori* EGF-Rezeptor abhängige Signaltransduktionswege sehr spezifisch und kontrolliert beeinflusst, um diese in bestimmte Richtungen zu lenken. Einerseits werden bestimmte Wege blockiert, andererseits werden wiederum bestimmte Wege gezielt aktiviert. Die Manipulation umfasst auf der einen Seite sowohl die Inhibierung des EGF-Rezeptors als auch die Blockierung von EGF-Rezeptor Signalmolekülen wie AKT, SHC und Grb2. Auf der anderen Seite induziert das Pathogen aber auch die konstante Aktivierung von Komponenten des EGF-Rezeptor Signalwegs (AKT Substrate, ERK1/2). Die Ergebnisse zeigen auch, dass der bakterielle Virulenzfaktor CagA in viele dieser Prozesse involviert ist.

4.3.8. Die Phosphatase SHP-2 vermittelt sowohl die Inaktivierung des EGF-Rezeptors als auch die EGF unabhängige Basalaktivierung von ERK1/2

Während die EGF abhängige Aktivierung von EGF-Rezeptor Signalmolekülen wie ERK1/2 sehr wahrscheinlich durch einen anderen Rezeptor vermittelt wird, könnte die EGF unabhängige Basalaktivierung von ERK1/2 durch die Aktivierung der Phosphatase SHP-2 ausgelöst werden. Diesbezüglich wurde beschrieben, dass sie den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg in *H. pylori* infizierten Zellen aktiviert (Higashi *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Phosphatase CagA abhängig aktiviert wird, und dass sie den EGF-Rezeptor an dem Tyrosinrest Y992 dephosphorylieren kann (Agazie und Hayman, 2003; Higashi *et al.*, 2002). SHP-2 könnte demnach nicht nur für die EGF-Rezeptor Dephosphorylierung verantwortlich sein, sondern auch die beobachtete Basalaktivierung von ERK1/2 induzieren. Dafür spricht, dass die vorherige Untersuchung der einzelnen EGF-Rezeptor Tyrosinreste auch eine starke Inhibierung der Aminosäureposition Y992 gezeigt hat (**siehe Abb. 4.20**).

Um die Hypothese zu überprüfen, wurde die Proteinexpression von SHP-2 mittels RNA-Interferenz reduziert und die EGF-Rezeptor Phosphorylierung in infizierten Zellen überprüft. Obwohl die Reduktion der SHP-2-Expression nur bei 30% lag (**Abb. 4.30A**) kam es hier im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit einer Luciferase-spezifischen siRNA behandelt wurden, wieder zu einem Anstieg der EGF-Rezeptor Phosphorylierung in infizierten Zellen (**Abb. 4.21&B**). Die Daten belegen demnach, dass die Phosphatase SHP-2 tatsächlich an der *H. pylori* vermittelten Inhibierung der EGFR-Transaktivierung beteiligt ist.

Zusätzlich zeigten infizierte Zellen, die mit der SHP-2 siRNA behandelt wurden, eine stark reduzierte Basalaktivierung von ERK1/2. SHP-2 ist demnach tatsächlich in die beobachtete Basalaktivierung *H. pylori* infizierter Zellen beteiligt. Im Gegensatz dazu war die EGF abhängige Aktivierung von ERK1/2 in infizierten und SHP-2 siRNA transfizierten Zellen erhöht. Dies unterstreicht nochmals, dass SHP-2 an der EGF-Rezeptor Inhibierung beteiligt ist. Durch die er-

höhte EGF-Rezeptor Transaktivierbarkeit in SHP-2 siRNA behandelten Zellen, kann ERK1/2 wieder regulär mit EGF über den EGF-Rezeptor induziert werden. Der EGF-Rezeptor unabhängige und abhängige Weg wirken hier synergistisch und verstärkten die ERK1/2 Antwort. Zusammenfassend kann mit diesem Experiment gezeigt werden, dass SHP2 sowohl die Basalaktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 initiiert als auch die EGF-Rezeptor Inhibierung in infizierten Zellen hervorruft.

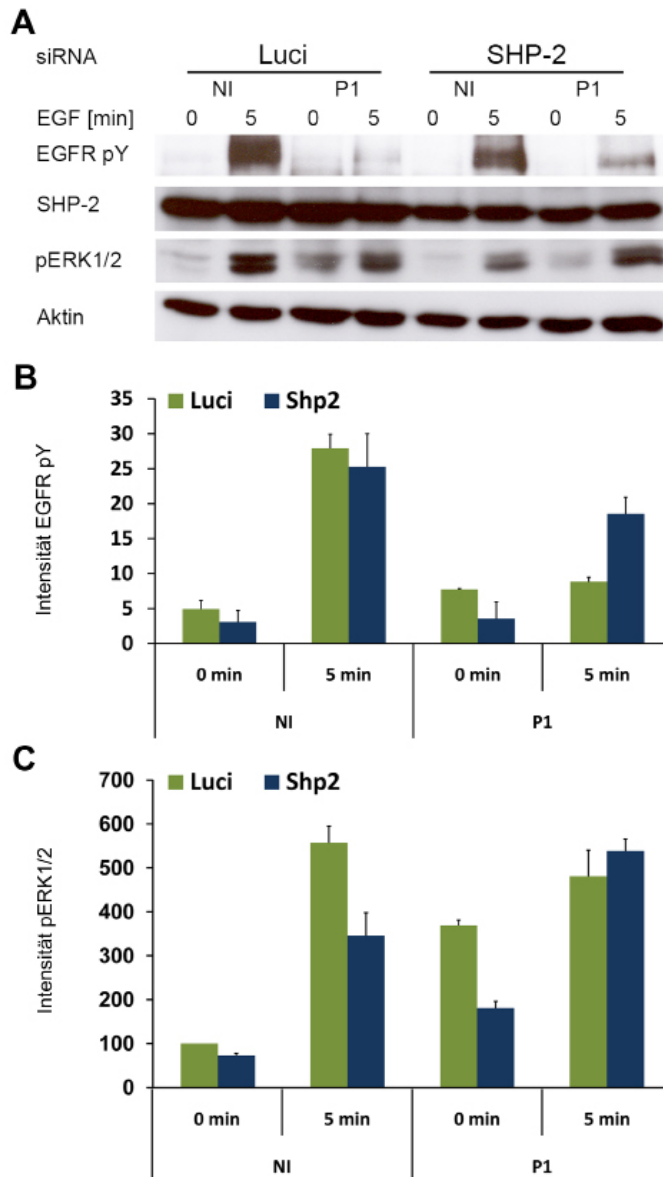


Abb. 4.30: Immunoblotanalyse der EGF-Rezeptor und ERK1/2 Aktivierung in SHP-2-siRNA transfizierten Zellen nach *H. pylori* Infektion.

Zellen wurden 48 h vor der Infektion mit siRNA gegen SHP-2 oder Luciferase (Luci) transfiziert. 20 h nach der Infektion mit P1 (MOI 100) wurden die infizierten und nicht infizierten (NI) Zellen mit einem Phosphotyrosin-spezifischen und pERK1/2-spezifischen Antikörper im Phosphoimager analysiert. Die Darstellung der Ladekontrolle erfolgte mit einem anti β -Aktin-Antikörper. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unterschiedlichen Experimenten ermittelt. A) Immunoblot; B/C) Quantifizierung der Bandenintensitäten von EGFR pY und pERK1/2 mit dem AIDA-Imaging Programm.

4.4. Diskussion Ergebnisteil 3 - *H. pylori* inhibiert die EGF-Rezeptor Transaktivierung und EGF abhängige Wundheilung

4.4.1. Kurzzeitinfection *versus* Langzeitinfection - Auswirkungen auf die zelluläre Signaltransduktion

Viele Forschungsarbeiten haben sich bisher mit der *H. pylori* induzierten EGF-Rezeptor Aktivierung in der anfänglichen Phase (0-130 min) der Infektion beschäftigt. So konnte u.a. beobachtet werden, dass der EGF-Rezeptor bereits 45 min nach der Infektion transaktiviert wird (Wallasch *et al.*, 2002). Zusammen mit den Ergebnissen, die gezeigt haben, dass in *H. pylori* infizierten Mägen eine hohe Expression von EGF und HB-EGF detektiert werden kann, führte dies zu der Hypothese einer EGF-Rezeptor vermittelten Magenkrebsentstehung in infizierten Patienten bekräftigen (Dickson *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2001). Denn eine erhöhte EGF-Rezeptor Signaltransduktion steht mit einer erhöhten Zellproliferation in Verbindung und ist so eng mit der Entstehung von Magenkrebs assoziiert (Yarden und Slivkowski, 2001).

Da es aber erst nach langjähriger Kolonisierung zu der Entstehung ernsthafter Krankheiten kommt, sind Studien, die sich mit dem Aktivierungszustand des Rezeptors nach längeren Infektionsperioden beschäftigen, von großer medizinischer Bedeutung. Erst die Ergebnisse solcher Forschungsansätze können wirklich eine Aussage darüber liefern, ob eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors tatsächlich in die Tumorentwicklung involviert ist. Um zumindest einen ersten Einblick in die Auswirkungen von längeren Infektionsperioden zu bekommen, wurden alle Analysen in diesem Teil der Arbeit erst nach 20 stündiger Infektion mit *H. pylori* durchgeführt. Dieser Zeitpunkt entspricht nicht einer Langzeitstudie. Da jedoch nach 20 h sowohl der *hummingbird* Phänotyp als auch die Inhibierung von Src vollständig induziert ist, und die Zellen noch nicht in die Apoptose gehen, kann unter Verwendung einer sehr hohen MOI von 100 zumindest ansatzweise eine Langzeitinfection *in vitro* simuliert werden.

Im vorherigen Teil der Arbeit konnte beobachtet werden, dass der EGF-Rezeptor 20 h nach der Infektion die Anzahl der EGF-Rezeptor Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen erhöht. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob es durch die verstärkte Oberflächenexposition zu einer erhöhten Bindung von Liganden an den EGF-Rezeptor kommt, die gleichzeitig zu einer Verstärkung der Signaltransduktion führt.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch, dass die EGF-Rezeptor Transaktivierung in Zellen 20 h nach der Infektion stark inhibiert ist. Unter Zugabe von EGF oder HB-EGF ist die EGF-Rezeptor Transaktivierung in infizierten Zellen nicht mehr induzierbar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Hemmung der EGF-Rezeptor Phosphorylierung nicht auf eine verringerte Proteinexpression des EGF-Rezeptors zurückgeführt werden kann, da diese in infizierten Zellen unverändert bleibt (Abb. 4.9; S. 56). Es handelt sich hier also um eine gezielte Blockade des EGF-Rezeptor Signalwegs. Demzufolge hat *H. pylori* einen Mechanismus entwickelt, die EGF-Rezeptor Signalkaskade in Zellen, die einer längeren Infektionsperiode unterliegen, selektiv zu inhibieren, obwohl die Rezeptoranzahl auf der

Zelloberfläche erhöht ist. Interessant wäre hier die Untersuchung von Gewebeschnitten infizierter Patienten. Eine immunohistologische Studie mit phosphospezifischen EGF-Rezeptor Antikörpern könnte aufklären, ob die anfänglich beobachtete Aktivierung des EGF-Rezeptors nach langen Infektionsperioden noch detektiert werden kann. Falls sie nicht mehr detektiert werden kann, würde dies die Aussage dieser Studie bekräftigen und die Untersuchung von Zellen nach 20 stündiger Infektion als *in vitro* Modell für Langzeitinfektionen hervorheben.

4.4.2. Die EGF-Rezeptor Inhibierung und ihre Konsequenzen für die Bildung von Magengeschwüren

4.4.2.1. Hemmung des Wundheilungsprozesses

Die Assoziation von *H. pylori* und Magengeschwüren ist ein zentrales Thema in der medizinischen Forschung. Bisher konnten einige wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass das Bakterium die Reepithelialisierung und somit die Wundheilung sowohl in Mäusen als auch im Zellkulturmodell durch die Sekretion des Virulenzfaktors VacA hemmt (Pai *et al.*, 1998; Tabel *et al.*, 2003). Außerdem konnte demonstriert werden, dass Patienten nach Magengeschwüroperationen, eine erheblich langsamere Wundheilung zeigten, wenn sie mit *H. pylori* infiziert waren (Kumar und Sinha, 2002). Die Ergebnisse einer anderen Studie führten wiederum zu der Erkenntnis, dass eine Eradizierung von *H. pylori* die Heilung von Geschwüren stark beschleunigt (Treiber und Lambert, 1998). Interessanterweise sind diese Daten nicht mit der Beobachtung zu vereinbaren, dass infizierte Patienten vermehrt die EGF-Rezeptor Liganden EGF und HB-EGF exprimieren. Diese müssten eigentlich eine verbesserte Wundheilung durch einer Erhöhung der Zellproliferation begünstigen (Tabel *et al.*, 2003). Die Aufklärung des molekularen Mechanismus könnte diese Diskrepanz erklären.

Die Inhibierung der EGF-Rezeptor Transaktivierung in *H. pylori* infizierten Zellen liefert die erste Erklärung für diesen Effekt. Normalerweise ist die EGF induzierte Zellproliferation ein wichtiger Schritt für die Reepithelialisierung von zerstörtem Gewebe, das beispielsweise durch starke inflammatorische Reaktionen während der Infektion entsteht (Tarnawski und Jones, 1998). Ist die EGF-Rezeptor Signaltransduktion jedoch nicht mehr funktionstüchtig, hat das erhebliche Auswirkungen auf die Wundheilung und führt so, trotz einer massiven Sekretion von Wachstumsfaktoren, zu einem erhöhten Risiko der Magengeschwürbildung, da die Wunde nicht mehr geschlossen werden kann (Abb. 4.33). Da die Inokulation von rekombinanten CagA in Mäusen ebenfalls die Heilung von Magengeschwüren stark verringert und da die hier beobachtete Inhibierung der EGF-Rezeptor Transaktivierung ebenfalls CagA abhängig ist, könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tatsächlich den molekularen Mechanismus für diese Beobachtungen beschreiben (Li *et al.*, 1997).

4.4.2.2. Erhöhte Säuresekretion

Im Gegensatz zu Patienten, die Magenkrebs haben, der immer mit einer reduzierten Säuresekretion (Hydrochloridia) assoziiert ist, ist die Voraussetzung für die Entstehung von Magengeschwüren ein niedriger pH-Wert des Magenmilieus (**Abb. 4.33**). Dieser Unterschied wird häufig als Ursache dafür diskutiert, dass sich die Entstehung von Magengeschwüren und Magenkrebs gegenseitig ausschließen (Axon *et al.*, 2007). Da der EGF-Rezeptor nicht nur in die Steuerung von Zellproliferation involviert ist sondern auch die Säuresekretion inhibiert, könnte sich hier ein weiterer Mechanismus erschließen, mit dem *H. pylori* die Entstehung von Magengeschwüren begünstigen könnte (Bower *et al.*, 1975; Konturek *et al.*, 1984). Die Blockade des EGF-Rezeptors könnte den Magen daran hindern gezielt die Säuresekretion zu unterbinden und würde so durch diesen zusätzlichen Effekt die Magengeschwürbildung fördern.

4.4.3. Die ERK1/2 Aktivierung in *H. pylori* infizierten Zellen liefert konkrete Hinweise auf komplexe Kontrollmechanismen der zellulären Signaltransduktion

An dieser Stelle stellt sich automatisch die Frage, warum die *H. pylori* induzierte Hemmung des EGF-Rezeptors die Wundheilung von verletztem Gewebe blockieren kann, wenngleich Signaltransduktionsmoleküle wie ERK1/2, die normalerweise die Proliferation von Zellen steuern, aktiviert sind bzw. EGF vermittelt aktivierbar bleiben. Um dies zu erklären muss, man sich die zelluläre Signaltransduktion als ein sehr kompliziertes und vielseitiges Netzwerk vorstellen, das einer sehr feinen Kontrolle unterliegt. Das gängige Modell postuliert, dass verschiedene Liganden bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivieren und damit zahlreiche Signalwege auf einmal einleiten. Diese Vorstellung ist jedoch veraltet und muss in Zukunft durch gezielte molekulare Analysen erweitert werden.

Vorstellbar ist, dass Zellen unzählige Kontrollmechanismen verwenden, die darüber entscheiden welche der vielen Signalkaskaden eingeleitet werden, wenn eine Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert wird. Das bedeutet, dass die Aktivierung von ERK1/2, welche im Immunoblot detektiert wird, nicht unmittelbar bedeutet, dass der Kinasekomplex nach seiner Phosphorylierung, augenblicklich alle seine bisher beschriebenen Funktionen erfüllt. Es ist viel realistischer, dass es in Abhängigkeit äußerer Einflüsse zu ganz unterschiedlichen zellulären ERK1/2 gesteuerten Reaktionen kommt. Die Wirkung sekretierter Botenstoffe umliegender Zellen könnte hierbei beispielsweise eine entscheidende Rolle spielen. Auch durch die Lokalisation der Kinasen in verschiedenen Zellkompartimenten könnten Prozesse dieser Art kontrolliert werden.

So wurde bereits beschrieben, dass der EGF-Rezeptor durch die Assoziation mit SHC und Grb2 in sog. *Multivesicular bodies* (MVBs) auf Erk1/2 trifft (**Abb. 4.22**) um die Kinasen dort zu aktivieren (Oksvold *et al.*, 2001). Dieser Weg der Signalweiterleitung ist in *H. pylori* infi-

zierten Zellen jedoch blockiert. Die Tatsache, dass die EGF abhängige Wundheilung in infizierten Zellen ebenfalls nicht mehr funktioniert obwohl ERK1/2 durch EGF aktivierbar bleibt, spricht dafür, dass genau dieser Weg normalerweise für die Regulation der EGF abhängigen Zellproliferation verantwortlich ist (Abb. 4.31). Ist der Weg über die *Multivesicular bodies* blockiert, ist auch die Zellproliferation gehemmt und die beobachtete ERK1/2 Aktivierung in *H. pylori* infizierten Zellen muss demnach eine andere Funktion haben.

Die RT-PCR Experimente dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass diese Funktion von ERK1/2 in der Regulation proinflammatorischer Prozesse zu finden ist. Dies wird dadurch begründet, dass sowohl die basale Aktivierung von ERK1/2 als auch die EGF abhängige ERK1/2 Aktivierung zu einer starken Expression des Zytokins IL-8 führt. Diese proinflammatorische Reaktion könnte durch die erhöhte Sekretion von EGF in infizierten Patienten potenziert werden und das umliegende Gewebe schädigen (Abb. 4.31). Dies würde bedeuten, dass EGF die Geschwürbildung in infiziertem Gewebe sogar eher begünstigt als sie zu hemmen.

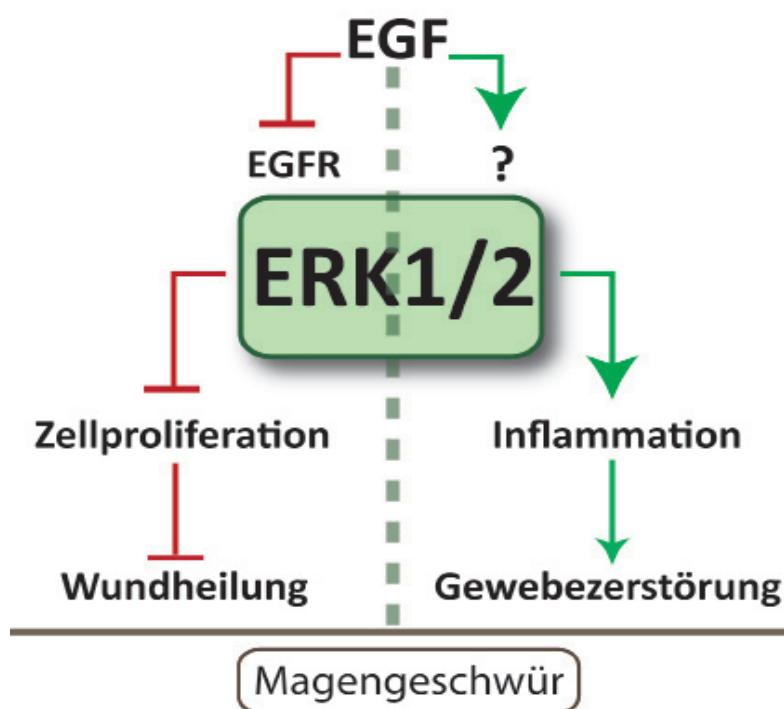


Abb. 4.31: Modell der ERK1/2 gesteuerten Signalkaskade in *H. pylori* infizierten Zellen.

Die *H. pylori* induzierte Hemmung der EGF-Rezeptor Transaktivierung verhindert, dass der Wachstumsfaktor EGF zellproliferatorische Prozesse initiieren kann (rot). Durch die Inhibierung der EGFR/SHC/Grb2 Komplexbildung gelangt der EGF-Rezeptor nicht in MVBs und kann ERK1/2 an dieser Stelle nicht aktivieren. Dieser Signaltransduktionsweg ist blockiert und führt zu einer gestörten Wundheilung. Gleichzeitig kommt es in infizierten Patienten zu einer verstärkten Ausschüttung von EGF. Dies induziert wiederum eine starke ERK1/2 vermittelte proinflammatorische Reaktion, die durch einen Faktor eingeleitet wird, der noch unbekannt ist (grün). Diese ERK1/2 Signalkaskade schädigt das umliegende Gewebe. Durch die inhibierte Wundheilung und

die proinflammatorische Reaktion ist die Wahrscheinlichkeit einer Magengeschwürentstehung sehr hoch.

Welche Faktoren könnten an der EGF vermittelten Aktivierung von ERK1/2 beteiligt sein?

Hierfür würde beispielsweise MEK1/2 in Frage kommen, da gezeigt werden konnte, dass der Kinasekomplex nach wie vor EGF abhängig induziert werden kann. Auch das Adaptorprotein p52 SHC könnte in dieser Signalkaskade eine Rolle spielen, da auch hier demonstriert werden konnte, dass EGF weiterhin eine Phosphorylierung dieser Isoform vermittelt. Da das Protein an zahlreichen Rezeptor-Tyrosinkinasen bindet, könnte es ebenfalls zu dem noch unbekannten EGF bindenden Rezeptor rekrutiert werden, um so die EGF abhängige ERK1/2 Aktivierung einzuleiten und proinflammatorische Prozesse zu induzieren. Ein möglicher Rezeptor, der für die Induktion dieser Signalkaskade in Frage kommt, wäre beispielsweise ein weiteres Mitglied der ErbB-Familie.

4.4.4. Die Analyse von weiteren EGF-Rezeptor Signalmolekülen liefert ein sehr differenziertes Aktivierungsmuster

Neben ERK1/2 sind noch andere Komponenten der EGF-Rezeptor Signalkaskade aktiviert, bzw. EGF abhängig induzierbar. Hierzu gehören z.B. bestimmte AKT Substrate und die Phospho-Lipase PLC γ . Es lassen sich aber auch Signalmoleküle finden, die inhibiert sind. Dazu zählt überraschenderweise AKT selbst. Die Induktion der aktiven AKT Substrate muss folglich über andere Kinasen verlaufen. Diese komplexen Aktivierungszustände machen deutlich, dass der EGF-Rezeptor Signaltransduktionsweg durch *H. pylori* sehr spezifisch manipuliert und kontrolliert wird, indem er sowohl die Aktivierung als auch die Inhibierung bestimmter Signalkaskaden einleitet.

Die CagA abhängige konstante Aktivierung von PLC γ könnte in die *H. pylori* induzierte Erhöhung der Zellmotilität involviert sein (**Abb. 4.32**), da die Lipase eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt (Jones und Katan, 2007). CagA interagiert sowohl mit PLC γ als auch mit dem HGF-Rezeptor c-Met und c-Met kann wiederum PLC γ aktivieren. Da dadurch motogene Prozesse induziert werden, unterstützen die Daten die Vermutung, dass die Lipase für die Zellmotilität verantwortlich ist (Churin *et al.*, 2003). Da außerdem gezeigt werden konnte, dass PLC γ auch AKT Substrate aktivieren kann, könnte die Lipase ebenfalls für die beobachtete Aktivierung bestimmter AKT Substrate verantwortlich sein (Medina *et al.*, 2004). Letztere könnten anti-apoptotischen Prozesse regulieren, die eine Eliminierung entarteter Zellen durch den natürlichen Zelltod inhibieren und damit das Krebsrisiko erhöhen. Eine konstante Aktivierung von PLC γ trotz fehlender Basalaktivierung von c-Met könnte sich mit der Assoziation von CagA und dem Rezeptor erklären lassen, durch die PLC γ kontinuierlich zu c-Met rekrutiert wird und so konstant phosphoryliert werden kann (**Abb. 4.32**).

4.4.5. Der c-Met Rezeptor – Ein Schlüsselfaktor in der *H. pylori* assoziierten Krebsentstehung?

In dieser Arbeit konnte auch beobachtet werden, dass der c-Met Rezeptor während einer verlängerten *H. pylori* Infektion, im Gegensatz zum EGF-Rezeptor, funktionstüchtig bleibt. Im Zusammenhang mit den Daten, dass die Assoziation von CagA und c-Met zu einer erhöhten Invasivität infizierter Zellen führt (**Abb. 4.32**), ist der c-Met Rezeptor in Bezug auf die *H. pylori* induzierte Krebsentstehung und Tumorprogression von besonderem medizinischem Interesse zu sein (Oliveira *et al.*, 2006). Weitere Daten die diese Hypothese unterstützen zeigen, dass c-Met häufig an der Entstehung von Magenkrebs und intestinalen Metaplasien beteiligt ist (Tang *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 1998). Auch die Hemmung des EGF-Rezeptors könnte Auswirkungen auf die c-Met Signalkaskade haben. Hier konnte gezeigt werden, dass die HB-EGF vermittelte Signaltransduktion zu einer Abspaltung der extrazellulären Domäne von c-Met führt, wodurch die HGF-vermittelte Signalkaskade von c-Met gehemmt wird (Xu und Yu, 2007). Eine Hemmung der EGF und HB-EGF abhängigen EGF-Rezeptor Aktivierung, könn-

te demnach auch zu einer verstärkten c-Met Signalkaskade führen, die wiederum das Risiko für die Entstehung von Magenkrebs vergrößert. Anhand einer Analyse der Menge an gespaltenem c-Met im Überstand von infizierten Zellen nach EGF Stimulation könnte diese Hypothese überprüft werden. Demzufolge könnte die Hemmung des EGF-Rezeptors einerseits die Entstehung von Magengeschwüren begünstigen und andererseits über eine Verstärkung der c-Met Signalkaskade die Tumorentstehung unterstützen. Falls das wirklich zutrifft, wäre dies das erste Modell, das zeigt, dass der EGF-Rezeptor auch im inaktivierten Zustand Krebs entstehen lassen kann.

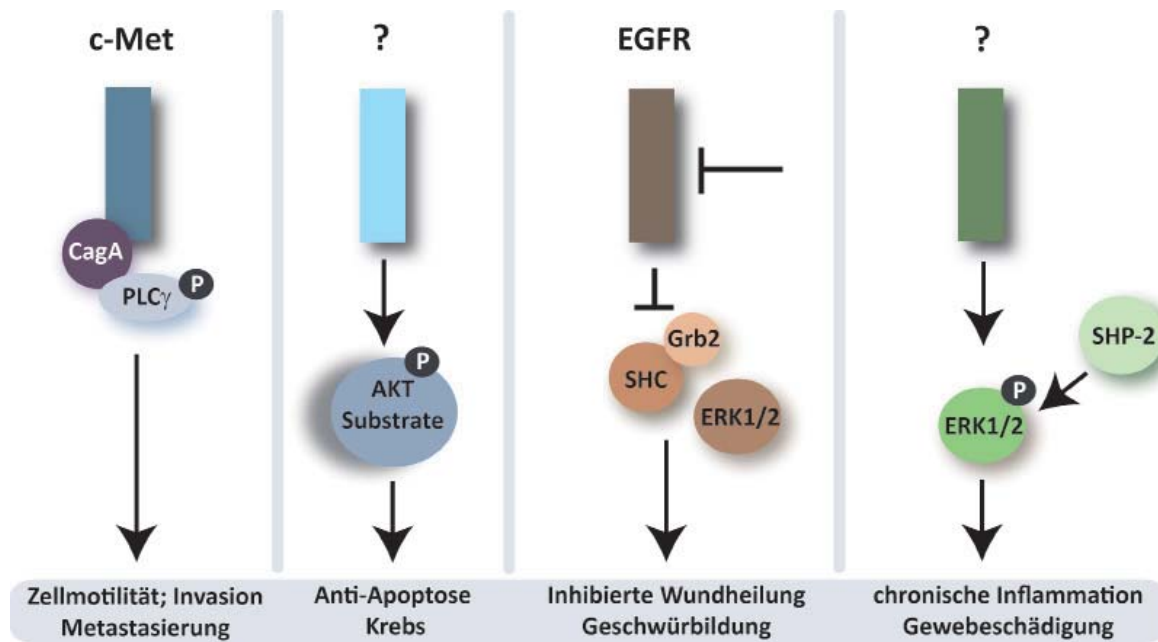


Abb. 4.32: Modell der veränderten Signaltransduktion in gastrischen Epithelzellen 20 h nach der Infektion mit *H. pylori*.

Durch die CagA abhängige Rekrutierung von PLCγ zu c-Met wird eine erhöhte Zellmotilität und Zellinvasion vermittelt. Dies begünstigt die Metastasierung entarteter Zellen. Gleichzeitig werden AKT Substrate durch einen unbekannten Rezeptor aktiviert, obwohl AKT selbst inhibiert ist. Da AKT in anti-apoptotische Prozesse involviert ist, könnte die unkontrollierte Aktivierung von AKT Substraten in infizierten Zellen zu einer Hemmung der Apoptose führen und so die Ausbreitung transformierter Zellen fördern. Das Risiko für die Entstehung von Krebs würde so stark erhöht sein. Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist inhibiert und die EGF-Rezeptor abhängige Aktivierung von ERK1/2 kann nicht mehr induziert werden. Dies begünstigt die Entstehung von Geschwüren, da die EGF vermittelte Zellproliferation gehemmt ist. Gleichzeitig kommt es aber durch die Phosphatase SHP-2 und einen unbekannten EGF bindenden Rezeptor zu einer Aktivierung von ERK1/2, die zu einer Erhöhung der proinflammatorischen Reaktion führt. Dies Schädigt das umliegende Gewebe und begünstigt so ebenfalls die Entstehung von Geschwüren.

4.4.6. Warum blockiert *H. pylori* die EGF-Rezeptor Transaktivierung?

Bisher ist noch nicht geklärt, warum *H. pylori* die Aktivierbarkeit des EGF-Rezeptors hemmt. Diesbezüglich lassen die Ergebnisse einiger Forschungsarbeiten vermuten, dass die Hemmung der EGF-Rezeptor Signalkaskade für das Magenpathogen tatsächlich von großem Nutzen sein könnte, da durch die Blockierung des EGF-Rezeptors die Sekretion des β-Defensins hBD3 (Humanes beta Defensin 3) inhibiert wird (Abb. 4.33). Hierbei handelt es sich um ein epitheliales antimikrobielles Peptid, dass der Bekämpfung von Magenpathogenen dient und besonders effektiv *H. pylori* bekämpft (Boughan *et al.*, 2006). Das Defensin ist stark in die an-

timikrobielle Bekämpfung von Gewebe involviert, das durch Geschwürbildung keine schützende Epidermis mehr besitzt (Sawamura *et al.*, 2005). Mit der gezielten Inhibierung der hBD3 Expression durch eine CagA abhängige Blockade des EGF-Rezeptor Signalwegs kann *H. pylori* möglicherweise diesen Abwehrmechanismus des Epithels umgehen.

Der Grund für die beobachtete Hochregulation der Rezeptoranzahl auf infizierten Zellen (**Abb. 4.3**), könnte darin liegen, dass der EGF-Rezeptor ein Rezeptor für den Virulenzfaktor VacA ist (Seto *et al.*, 1998). Die CagA abhängige Hochregulation des Rezeptors könnte demnach die Aufnahme des vakuolisierenden Effektors begünstigen und so erklären, warum die Anwesenheit von CagA so stark mit der Expression des VacA-Genotyps s1/m1 assoziiert ist, der eine höhere Virulenz aufweist als andere Genotypen (Atherton *et al.*, 1995; Garner und Cover, 1995).

4.4.7. Die CagA abhängige Aktivierung von SHP-2 inhibiert den EGF-Rezeptor

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern nicht nur eine Erklärung für die komplexen Zusammenhänge zwischen *H. pylori* Infektionen und Magengeschwürentstehung, sondern gewähren auch mechanistische Einblicke in den entsprechenden molekularen Mechanismus. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphatase SHP-2 die CagA abhängige Inhibierung des EGF-Rezeptors vermittelt. SHP-2 gehört wie SHP-1 zu den Phosphotyrosin-Phosphatasen, die eine große Rolle in der Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen (Grandal und Madhus; Neel 2003; Neel 1997). Da SHP-2 den Kinase-Komplex ERK1/2 auch unabhängig von dem EGF-Rezeptor abhängigen SHC/Grb2 Komplex aktivieren kann, ist die Phosphatase besonders an der positiven Signalweiterleitung beteiligt (Cunnick *et al.*, 2002; Deb *et al.*, 1998). Durch die Inhibierung von GAP (GTPase aktivierendes Protein), das den ERK1/2 Signalweg blockiert, kann SHP-2 eine Verstärkung der ERK1/2 Kaskade induzieren. Die Hemmung dieses Proteins verläuft hierbei über die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptor Tyrosins Y992 (Agazie und Hayman, 2003). Hier konnte gezeigt werden, dass die bereits bekannte CagA abhängige Aktivierung von SHP-2 in Zellen, nicht nur zu der Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors führt (**Abb. 4.33**), sondern auch eine konstante, EGF unabhängige Aktivierung von ERK1/2 hervorruft (Higashi *et al.*, 2002).

4.4.8. Schlusswort

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse komplexe Einblicke in pathogeninduzierte Manipulationen von wirtszellspezifischen Signaltransduktionsprozessen, deren Veränderungen schwerwiegende Einflüsse auf die unmittelbare Umgebung infizierter Gewebeabschnitte haben können. Basierend auf den Ergebnissen lässt sich ein Modell konstruieren, das den molekularen Mechanismus der *H. pylori* vermittelten Entstehung von Magengeschwüren durch eine SHP-2-abhängige Inhibierung der EGFR-Transaktivierung erklärt (**Abb. 4.33**). Außer-

dem liefert die Arbeit viele Hinweise auf noch unbekannte, regulatorische Mechanismen der eukaryotischen Signaltransduktion, die durch den Einsatz komplexer pathogeninduzierter Stimuli sichtbar gemacht werden können. Durch die weitere Aufklärung molekularer Details von *H. pylori* gesteuerten Eingriffen in wichtige Signaltransduktionswege infizierter Zellen sollte es in Zukunft möglich sein, die Ursachen für die Entstehung ernsthafter Krankheiten wie Magenkrebs und Magengeschwüre besser zu verstehen und tiefgehende Einblicke in die Welt der zellulären Signalweiterleitung zu erhalten.

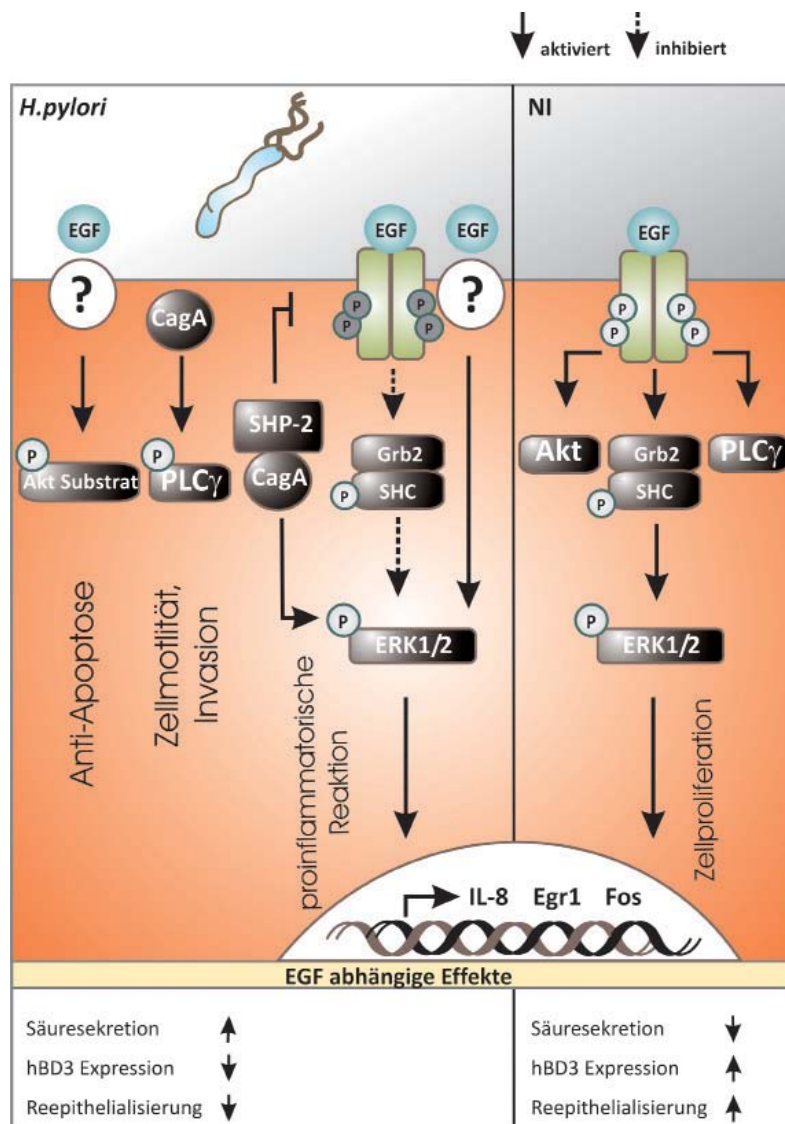


Abb. 4.33: Modell der *H. pylori* vermittelten Inhibition der EGF-Rezeptor Transaktivierung und deren Auswirkungen auf die ERK1/2 Signalkaskade und Geschwürbildung.

In nicht infizierten (NI) Zellen induziert die Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor eine Rekrutierung von Grb2 und SHC, die zusammen mit dem EGFR einen Komplex bilden. Dieser Komplex aktiviert ERK1/2 und die EGF abhängige Zellproliferation. In *H. pylori* infizierten Zellen wird die Liganden abhängige EGFR Transaktivierung durch eine CagA abhängige Aktivierung von SHP-2 inhibiert. Dies führt zu einer Hemmung der SHC/Grb2-vermittelten Signalkaskade und zu einer Blockierung der EGF vermittelten Zellproliferation. Die Aktivierung von SHP-2 führt zu einer EGFR unabhängigen Aktivierung von ERK1/2. Zusätzlich kann ERK1/2 durch einen unbekannten Faktor auch EGF abhängig aktiviert werden. Auch die Expression ERK1/2 induzierter Gene (Fos, Egr1 und IL-8) ist weiterhin durch EGF induzierbar und verstärkt so die proinflammatorische Reaktion. Die Inhibition der EGFR Transaktivierung führt zu einer erhöhten Säuresekretion, zu einer inhibierten hBD3 Expression und Reepithelialisierung und begünstigt so die Entstehung von Geschwüren. Gleichzeitig aktiviert CagA dauerhaft das EGF-Rezeptor Substrat PLC γ . Dies könnte der Grund für die erhöhte Zellinvasion und

Zellmotilität von *H. pylori* infizierten Zellen sein. Der Aktivierungszustand von AKT-Substraten ist trotz der Inhibition von AKT selbst sehr unterschiedlich. Einerseits kommt es zur Blockierung von AKT Substraten, andere werden wiederum aktiviert. Diese Prozesse könnten wiederum antiapoptotische Effekte hervorrufen.

5. Identifikation von bakteriellen NF- κ B Effektoren, Typ IV Sekretionssystem-Komponenten und Adhäsinen von *H. pylori* durch einen genomweiten bakteriellen Screen

Obwohl das T4SS von *H. pylori* zu den Hauptvirulenzfaktoren von pathogenen Typ I Stämmen gehört, sind seine Funktion und auch seine Struktur noch nicht vollständig geklärt. Entdeckt wurde es auf der Suche nach der genomischen Lokalisation des bakteriellen Effektors CagA (Censini *et al.*, 1996). Hierbei stellte sich heraus, dass das CagA-kodierende Gen Teil einer genomischen Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) ist, deren Gene eine ausgeprägte Homologie zu den Genen des *vir* Operons des Pflanzenpathogens *A. tumefaciens* zeigen (siehe Abb. 1.5; S. 22). Das *vir* Operon des Pflanzenbakteriums kodiert für einen nadelförmigen Proteinkomplex mit dessen Hilfe das Pflanzenpathogen DNA und DNA-assoziierte Proteine in die Wirtszelle transloziert. Es repräsentiert den Prototyp für bakterielle Typ IV Sekretionssysteme, dessen Ursprung in bakteriellen Konjugationssystemen liegt (Covacci und Rappuoli, 2000).

Das T4SS von *H. pylori*

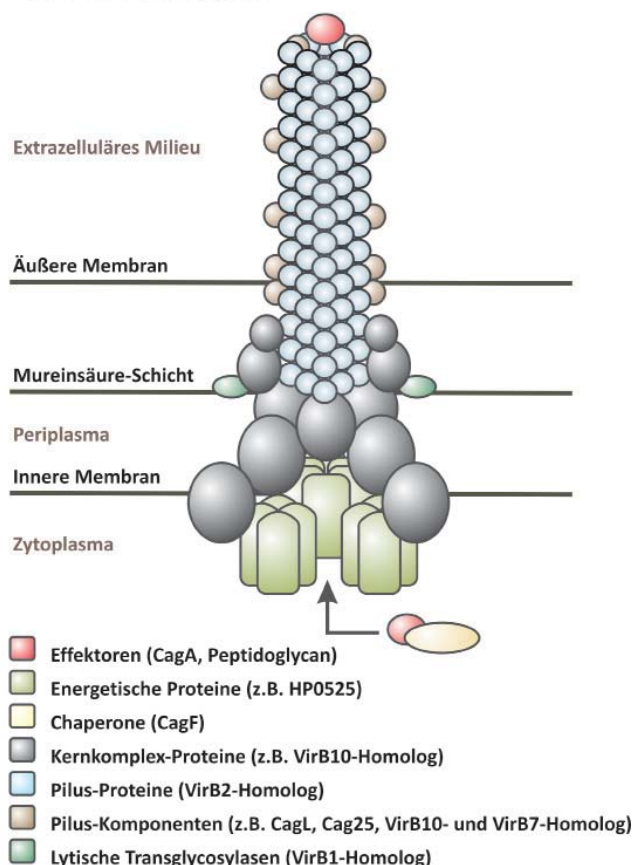


Abb. 5.1: Hypothetischer Aufbau des T4SSs von *H. pylori*.

Die nadelförmige Proteinstruktur reicht vom Zytoplasma in das extrazelluläre Milieu. Die Energie-liefernden Protein-Komplexe wie die ATPase HP0525 sitzen im zytoplasmatischen Bereich. Kernkomplex-Proteine wie das VirB10-Homolog durchziehen die innere Membran und das Periplasma. Der Pilus, der aus einer Vielzahl von Monomeren wie dem VirB2-Homolog besteht, ragen durch die äußere Membran in das extrazelluläre Milieu. Dort trifft der Pilus auf die Wirtszellmembran. Chaperone wie CagF vermitteln die Translokation von Effektoren wie CagA und Peptidoglycan.

Anhand der bisher gewonnen Daten konnte zwar ein hypothetisches Modell des T4SSs entwickelt werden, das in seiner Struktur sehr dem nadelförmigen Aufbau des T4SSs von *A. tumefaciens* ähnelt (Abb. 5.1). Betrachtet man jedoch elektronenmikroskopische Aufnahmen bakterieller Oberflächenstrukturen, wird deutlich, dass diese Strukturen viel zu dick sind, um als nadelförmig beschrieben werden zu können. Es handelt

sich hierbei vielmehr um schlauchartige Membranfortsätze (Kwok *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). Hinzu kommt, dass es zwar Hinweise auf die Existenz eines Pilus-Proteins gibt (Abb. 5.1), die Daten die dies zeigen sind jedoch nicht überzeugend und machen deutlich, dass die Erforschung des T4SSs von *H. pylori* noch nicht abgeschlossen ist (An-drzejewska *et al.*, 2006).

Nicht alle Gene der 19 ORFs (*open reading frame*; Offener Leserahmen) sind für die funktionale Integrität des T4SSs von *H. pylori* von Bedeutung. Proteine wie HP0524 (VirD4 Homolog) und CagA selbst haben beispielsweise keinen Einfluss auf die Funktionalität des T4SSs (Selbach *et al.*, 2002b). Dennoch sind die meisten Genprodukte der *cagPAI* für den Aufbau des T4SSs absolut essentiell (Selbach *et al.*, 2002b).

Chaperone wie das Protein CagF und die ATPase HP0525 sind für eine T4SS vermittelte Translokation von CagA absolut notwendig (Pattis *et al.*, 2007; Savvides *et al.*, 2003). Dennoch liegt es nahe, dass noch andere Proteine existieren, die nicht auf der *cagPAI* kodiert sind, aber für eine volle Funktionalität des T4SSs benötigt werden. In diese Kategorie fällt das Protein HP1451, welches die wichtige ATPase HP0525 kontrolliert (Hare *et al.*, 2007). Seine Entdeckung unterstützt die Theorie, dass noch mehrere bisher unbekannte Proteine dieser Art existieren und unterstreicht die Notwendigkeit, weitere Proteine dieser Kategorie zu identifizieren, um die Möglichkeiten für zielgerichtete antibakterielle Therapieansätze zu vergrößern.

Die bei *H. pylori* infizierten Patienten auftretende Gastritis wird als Hauptverursacher für die Entstehung schwerwiegender Krankheiten diskutiert. Hervorgerufen wird sie durch eine chronische Inflammation, die einerseits der Bekämpfung der Infektion dient, andererseits schwerwiegende mukosale Schäden verursacht. Die chronische Inflammation wird sowohl durch die Adhäsion der Bakterien an das Wirtsepithel als auch durch die Sekretion bakterieller Faktoren wie Urease induziert, die die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie IL-8 und Gro- α einleiten (Bodger und Crabtree, 1998). Die Expression dieser Zytokine steht unter der Kontrolle von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1. Während die NF- κ B-Aktivierung in *H. pylori* infizierten Mäusen T4SS unabhängig ist, wird die Aktivierung von NF- κ B im Menschen hauptsächlich durch das T4SS induziert (Ferrero *et al.*, 2008). Aber auch in menschlichen Zellen konnten T4SS unabhängige Signaltransduktionswege entdeckt werden, die zu einer *H. pylori* induzierten NF- κ B Aktivierung führen (Abb. 5.2). Während einige Studien zeigen, dass die T4SS unabhängige Aktivierung im Menschen nur in monozytischen Zellen zu finden ist (Maeda *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007), lassen die Ergebnisse anderer Studien darauf schließen, dass der T4SS unabhängige Weg auch in gastrischen Epithelzellen funktioniert (Bauer *et al.*, 2005; Neumann *et al.*, 2006; Takenaka *et al.*, 2004). Hierbei könnte beispielsweise das bakterielle Membranprotein OipA (*outer inflammatory protein A*) eine große Rolle spielen, das nicht nur die Adhäsion der Bakterien sondern auch die Sekretion von IL-8 durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat1 induziert (Yamaoka *et al.*, 2004).

Für die in Monozyten stattfindende NF- κ B Aktivierung sind bisher drei bakterielle Virulenzfaktoren bekannt. Hierzu gehören das Heat shock protein 60 (HSP60), das nur schwach immunogene Lipopolysaccharid (LPS) und die sekretierte Urease-Untereinheit B (Gobert *et al.*, 2004; Takenaka *et al.*, 2004; Yokota *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Bei den beiden ersten Virulenzfaktoren verläuft die NF- κ B Antwort über den *Toll like receptor 2* (TLR2), ein nicht-katalytischer Oberflächenrezeptor der bakterielle Antigene erkennt und die angeborene Im-

munantwort initiiert. Die Urease-Untereinheit B induziert die NF- κ B-Antwort durch eine Bindung an die Membran-gebundene Untereinheit der HLA (humanes Leukozyten Antigen) Klasse II assoziierten invarianten Peptidkette (CD74), die die Aktivität von MHC (*Major histocompatibility complex*) Klasse II Molekülen auf der Oberfläche von B Lymphozyten und Makrophagen reguliert (**Abb. 5.2**) (Beswick *et al.*, 2006a).

Bis heute sind nur zwei Effektoren bekannt, die durch das T4SS in die Wirtszelle transloziert werden: Peptidoglycan und CagA (Stein *et al.*, 2000;Viala *et al.*, 2004). Peptidoglycan leitet in der Wirtszelle über den intrazellulären Rezeptor Nod1 die Aktivierung von NF- κ B ein (**Abb. 5.2**) und ist bisher der einzige bekannte translozierte Faktor, der die T4SS vermittelte NF- κ B Aktivierung in humanen Epithelzellen induziert (Viala *et al.*, 2004). Andere bekannte Typ IV Sekretionssysteme wie das korrespondierende Modell-T4SS des Pflanzenpathogens *A. tumefaciens* und das T4SS von *L. pneumophila* transferieren jedoch eine große Anzahl an Effektoren in die Wirtszellen. (Backert und Meyer, 2006;Shin und Roy, 2008). Daher ist es naheliegend, dass auch bei *H. pylori* noch weitere Effektoren existieren, die T4SS vermittelt transloziert werden.

Obwohl bis heute nur ein translozierter Faktor identifiziert werden konnte der NF- κ B über Nod1 aktiviert, sind drei weitere Signaltransduktionskaskaden bekannt, die eine T4SS abhängige NF- κ B Antwort hervorrufen können. Das T4SS von *H. pylori* kann NF- κ B beispielsweise auch über den Protein-Komplex Traf6/MyD88/Tak1 aktivieren (**Abb. 5.2**). Andererseits kann die Signalkaskade ebenfalls über den Kinase-Komplex NIK/PAK1 verlaufen (Hirata *et al.*, 2006;Neumann *et al.*, 2006). Während bekannte Induktoren dieses Signalwegs u.a. das Zytokin Interleukin 1 beta (IL-1 β) oder bakterielles LPS sein können, konnte für beide Wege bisher jedoch noch kein bakterieller Effektor entdeckt werden, der durch das T4SS von *H. pylori* transloziert wird und diese Signalwege induziert (**Abb. 5.2**). Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass noch andere T4SS abhängige Signaltransduktionsprozesse existieren, die noch nicht entdeckt wurden.

Bisher werden *H. pylori* infizierte Patienten mit einer sog. Tripeltherapie behandelt, die aus einem Protonenhemmer und den Antibiotika Clarithromycin und Metronidazol besteht. Neben starken Nebenwirkungen wie Übelkeit und blutenden Schleimhäuten führt diese Behandlung leider auch zu der Eradizierung zahlreicher anderer Bakterien im Magen und Darm, die für eine funktionierende Verdauung und ein erfolgreiches Immunsystem sehr wichtig sein können (*Helicobacter* Konferenz, Helsingoer 2008). Hierzu gehören beispielsweise *Lactobacilli*. Die Veränderungen der Bakterien-Populationen sind noch Jahre nach der Behandlung nachweisbar und machen deutlich, dass neue zielgerichtete Therapieansätze entwickelt werden müssen, um die Infektionen zu bekämpfen.

Um sowohl neue translozierte Effektoren zu entdecken als auch unbekannte T4SS Komponenten zu identifizieren, sollte in dieser Arbeit eine Hochdurchsatz-Rastersuche (*Screen*) entwickelt werden. Da die Aktivierung von NF- κ B in humanen Epithelzellen T4SS abhängig ist, wurde diese Wirtszellantwort für den *Screen* ausgewählt. Erste Testergebnisse zeigen, dass die hier entwickelte *Screening*-Methode tatsächlich die Möglichkeit bietet die oben genann-

ten Faktoren durch ihre Verbindung mit der *H. pylori* induzierten NF- κ B Aktivierung, zu finden. Zusätzlich können mit diesem Versuchsansatz sogar bakterielle Adhäsine identifiziert werden.

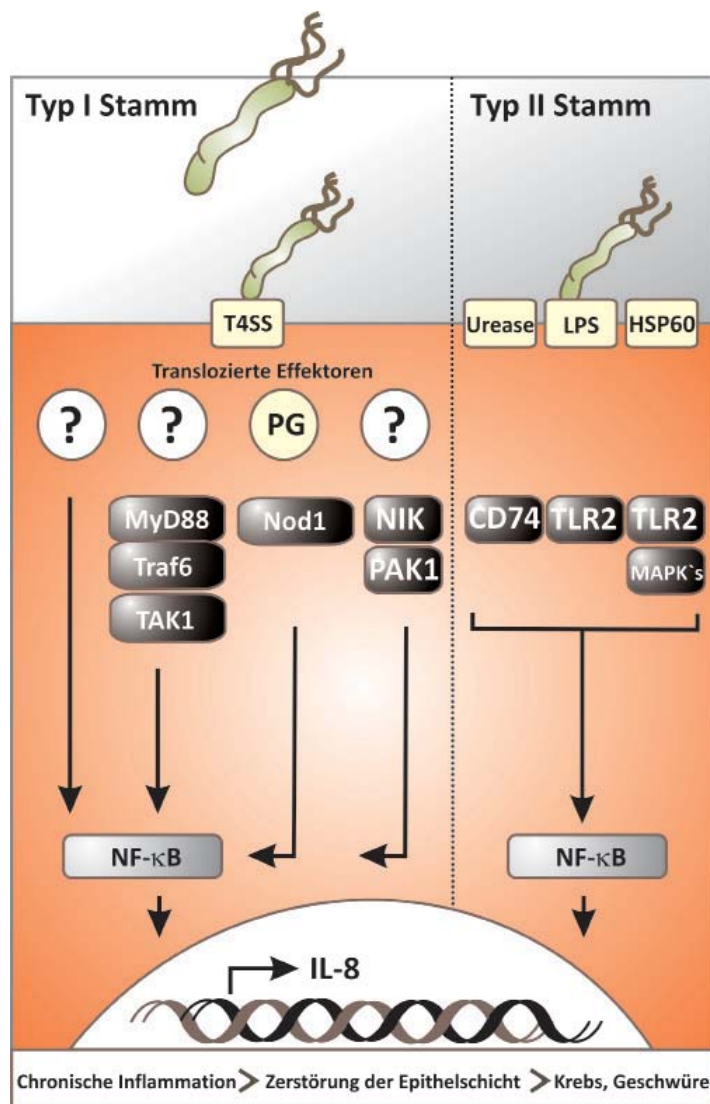


Abb. 5.2: Modell der T4SSs abhängigen und T4SS unabhängigen NF- κ B Aktivierung in *H. pylori* infizierten Zellen.

Während Typ I Stämme ein funktionstüchtiges T4SS exprimieren, findet man bei Typ II Stämmen kein T4SS. Bisher sind sowohl T4SS abhängige als auch T4SS unabhängige Signaltransduktionswege bekannt, die zu einer Aktivierung von NF- κ B und der darauf folgenden Expression von Zytokinen wie IL-8 führen. Durch die chronische Inflammation wird die Epithelschicht zerstört, was nach jahrelanger Infektion zu der Entstehung von Magenkrebs oder Magengeschwüren führen kann. Während in humanen Monozyten sowohl LPS als auch HSP60 NF- κ B über den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) aktivieren, induziert Urease die NF- κ B Antwort über den Wirtszellrezeptor CD74. In menschlichen Epithelzellen dominiert die T4SS abhängige NF- κ B Aktivierung, für die bisher nur ein bakterieller Effektor identifiziert werden konnte: Peptidoglycan. Das Polysaccharid-Peptid wird über den intrazellulären Rezeptor Nod1 erkannt. Für alle anderen bekannten T4SS abhängigen Signaltransduktionswege in Epithelzellen ist der Effektor noch unbekannt. Es ist nicht auszuschließen, dass noch weitere T4SS abhängige Signaltransduktionswege existieren, deren bakterielle und wirtszellspezifische Faktoren noch identifiziert werden müssen.

5.1. Der erste manuelle Etablierungsschritt für den *Screen*: Auf der Suche nach der geeigneten MOI und Infektionszeit

Für den Screen wurde eine stabile Reporterzelllinie humanen gastrischen Ursprungs verwendet, die ein Fusionsprotein exprimiert, welches aus der NF- κ B Untereinheit p65 und GFP (*green fluorescent protein*) besteht (siehe Material und Methoden; S. 128). Durch die *H. pylori* induzierte Aktivierung von NF- κ B wird das Fusionsprotein in den Nukleus transportiert (Abb. 5.3). Dieses Translokationsereignis wird mit Hilfe eines automatischen Fluoreszenz-Mikroskops für jede Zelle in einem Ansatz erfasst und anschließend mit einem entsprechenden Computer-Programm quantitativ ausgewertet (siehe Material und Methoden; S. 128-129). Als Ergebnis erhält man die Anzahl aller aktivierten Zellen pro Ansatz. Zusammen mit einer genomumfassenden, Transposon-basierten Mutanten-Bibliothek von *H. pylori*, sollte diese Methode dazu verwendet werden, Mutanten zu identifizieren, die entweder keine oder eine veränderte NF- κ B Aktivierung zeigen. Durch eine anschließende Charakterisierung der entsprechenden Mutanten und der Lokalisation der jeweiligen Mutationen können dann translozierte bakterielle NF- κ B Induktoren, T4SS Komponenten und Adhäsine identifiziert werden, deren Funktionstüchtigkeit einer Voraussetzung für die T4SS induzierte NF- κ B Antwort darstellt.

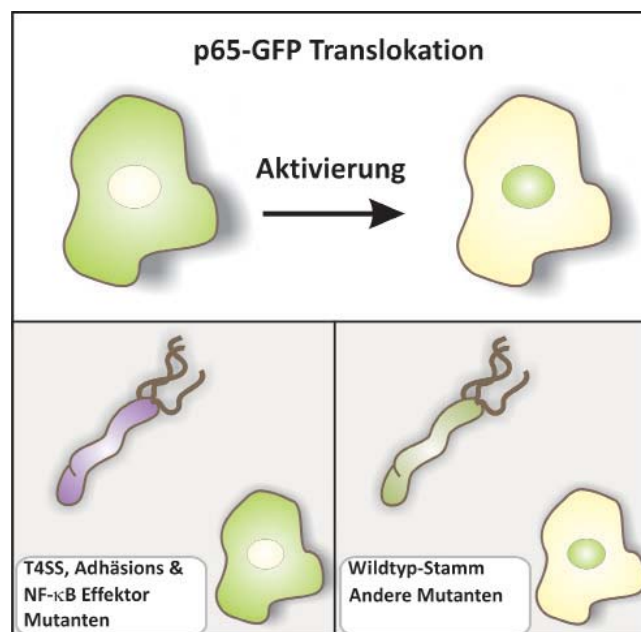


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der theoretischen Screening-Strategie.

Die Reporterzelllinie AGS SIB02, die das Fusionsprotein p65-GFP exprimiert, wird mit Einzelklonen einer bakteriellen, Transposon-basierten Mutanten Bibliothek infiziert. Eine Aktivierung von NF- κ B zeigt sich durch eine nukleare Translokation des Fusionsproteins. Mit der Hilfe eines automatischen Mikroskops und einer Computer-gestützten Analyse wird die Anzahl aller Zellen pro Ansatz ermittelt, in denen das Fusionsprotein im Nukleus lokalisiert werden kann. Alle Ansätze, die keine aktivierten Zellen zeigen, wurden mit Einzelklonen infiziert, die entweder eine Mutation im T4SS tragen, oder Mutationen in Adhäsinen und NF- κ B Effektoren aufweisen. Diese Mutanten werden als *Hits* (Treffer) definiert. Alle Ansätze in denen die Zellen eine normale NF- κ B Antwort zeigen, sind entweder mit dem Wildtyp-Stamm, oder mit nicht in Frage kommenden Mutanten infiziert worden.

Vorherige Analysen mit der Reporterzelllinie AGS SIB02 haben gezeigt, dass die *H. pylori* induzierte NF- κ B Antwort zeitabhängig oszilliert (Bartfeld *et al.*, in Vorbereitung). Außerdem

unterscheiden sich die Aktivierungshöhepunkte in Abhängigkeit der verwendeten MOI und des verwendeten Stamms voneinander. Da die Mutanten-Bibliothek mit dem *H. pylori* Stamm G27 hergestellt wurde, sollte zunächst getestet werden, welche Infektionszeiten und welche MOI die höchste NF- κ B Aktivierung bzw. die höchste Anzahl an aktivierten Zellen zeigen, wenn diese mit dem Stamm G27 infiziert werden. Da man für die Identifikation von Mutanten, die keine oder nur eine geringfügige Aktivierung zeigen, schnell erfassbare Unterschiede zur Wildtyp-Aktivierung benötigt, ist dieser Schritt sehr wichtig.

Als Positivkontrolle wurde die isogene Deletionsmutante G27 Δ cagE eingesetzt, die kein funktionstüchtiges T4SS exprimiert und demzufolge auch keine NF- κ B Aktivierung induziert. Als Negativkontrolle diente der Wildtyp-Stamm G27. Für das Zeitverlaufsexperiment wurde die AGS SIB02 Zelllinie im 96-Well Maßstab ausgesät und mit unterschiedlichen MOIs infiziert. Die Zugabe der je nach MOI unterschiedlich verdünnten Bakteriensuspension erfolgte manuell mit einer 12-Kanal Pipette in einem Zeitintervall von 15 min und wurde nach 120 min durch die Fixierung mit kaltem Methanol abgestoppt (Abb. 5.4).

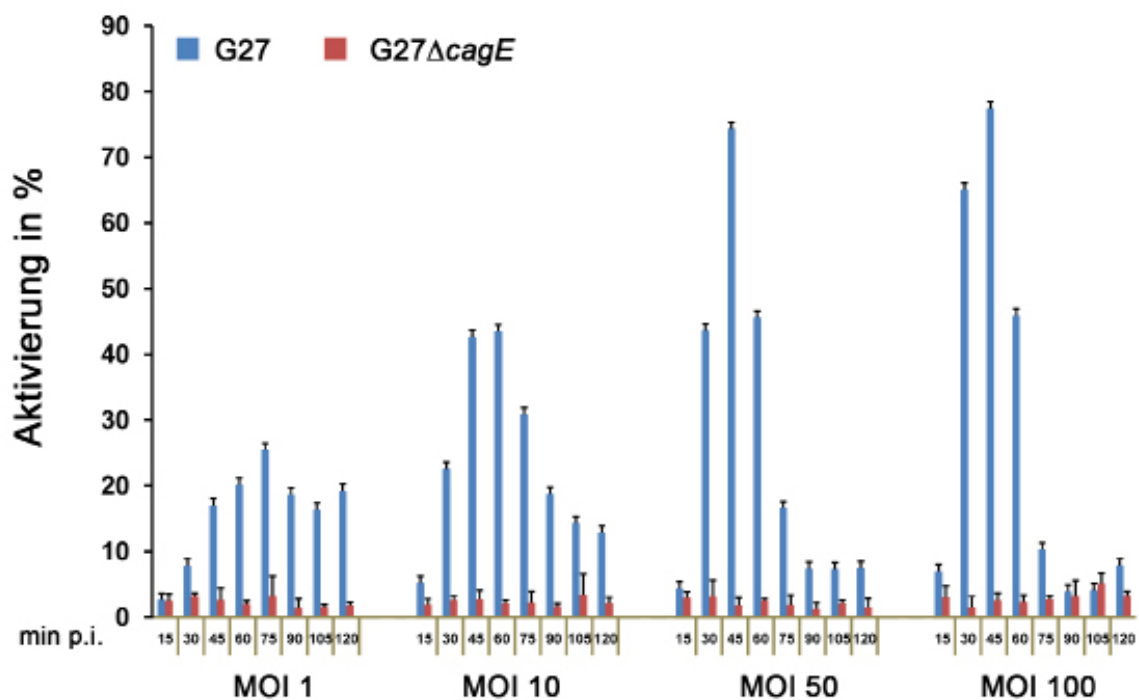


Abb. 5.4: Analyse der geeigneten Infektionszeit und MOI.

AGS SIB02 Zellen wurden im 96-Well-Maßstab ausgesät und mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm G27 sowie der isogenen Deletionsmutante G27 Δ cagE unter Verwendung unterschiedlicher MOIs infiziert. Die Infektion erfolgte in einem Zeitintervall von 15 min und wurde nach einer Gesamtzeit von 120 min abgestoppt. Die prozentuale Anzahl aktivierter Zellen pro Ansatz (Well) wurde mit einem automatischen Fluoreszenz-Mikroskop und einer anschließenden Computeranalyse ermittelt (siehe Material und Methoden; S. 128-129). Die Standardabweichung wurde durch die Messung von Triplikaten ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der *H. pylori* Stamm G27 einen NF- κ B Aktivierungshöhepunkt nach ca. 45 min Infektion hervorruft. Nach 120 min Infektion mit dem *H. pylori* Stamm G27 kann keine Aktivierung der Zellen mehr detektiert werden, was darauf hindeutet, dass nicht nur bakterielle NF- κ B Aktivatoren sondern auch bakterielle NF- κ B Inhibitoren existieren könnten. Infektionen mit der T4SS Mutante G27 Δ cagE zeigen hingegen keine Aktivie-

rung. Dies verdeutlicht, dass die verwendete Methode T4SS abhängig und somit für die bevorstehende Anwendung geeignet ist. Die Anzahl der NF- κ B aktivierten Zellen nimmt in den Ansätzen, die mit G27 infiziert wurden, proportional zur verwendeten MOI zu. Während des Screens muss demnach mit einer hohen MOI von 100 infiziert werden, damit in allen Kontrollansätzen eine möglichst hohe Anzahl an aktivierten Zellen erreicht werden kann. Anhand dieser Ergebnisse konnten sowohl der 45 min als auch der 120 min Zeitpunkt als geeignete Analysezeitpunkte für den Screen festgelegt werden. Mit dieser Strategie besteht die Möglichkeit einerseits Mutanten zu identifizieren, die bei 45 min eine verringerte Aktivierung zeigen. Andererseits können aber auch Mutanten entdeckt werden, die nach 120 min eine erhöhte Aktivierung induzieren. So kann man nicht nur NF- κ B-Aktivatoren sondern auch NF- κ B-Inhibitoren finden.

Um zu überprüfen, ob sich die Aktivierungskurve zu späteren Zeitpunkten nochmals ändert wurden in einem weiteren Zeitverlaufsexperiment noch spätere Infektionszeitpunkte untersucht (Abb. 5.5). Hierbei wurden die Aktivierungskurven des *H. pylori* Stamms G27 zusätzlich mit denen eines anderen *H. pylori* Wildtyp-Stamms (P1) verglichen.

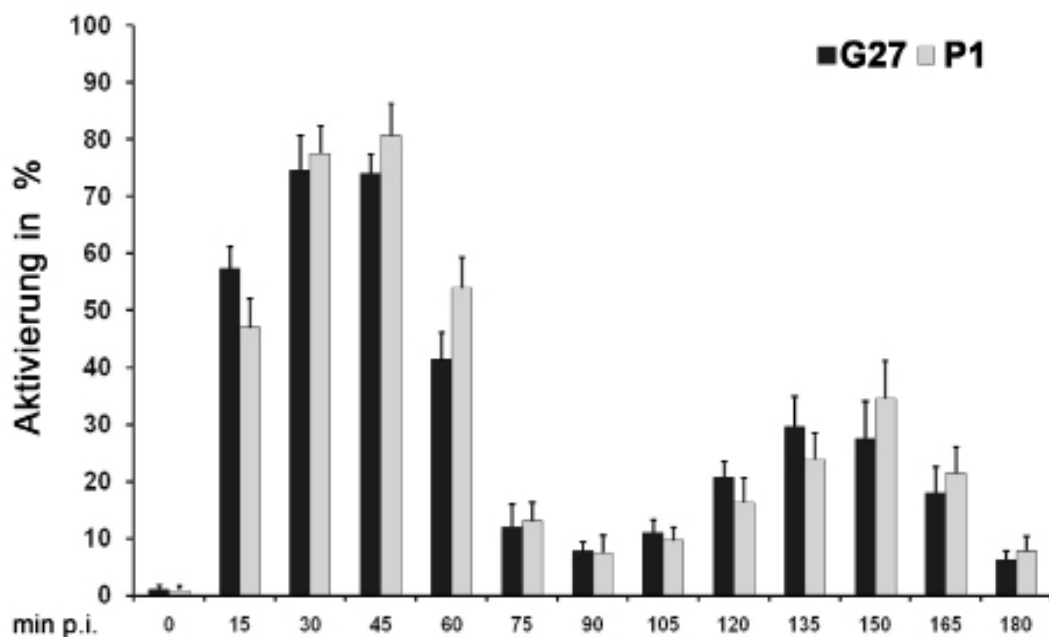


Abb. 5.5: Analyse der geeigneten Infektionszeit und MOI.

AGS SIB02 Zellen wurden im 96-Well-Maßstab ausgesät und mit den *H. pylori* Wildtypstämmen G27 und P1 infiziert (MOI 100). Die Infektion erfolgte in einem Zeitintervall von 15 min und wurde nach einer Gesamtzeit von 180 min abgestoppt. Die prozentuale Anzahl aktivierter Zellen pro Ansatz (Well) wurde mit einem automatischen Mikroskop und einer anschließenden Computeranalyse ermittelt (siehe Material und Methoden; S. 128-129). Die Standardabweichung wurde durch die Messung von Triplikaten ermittelt.

Die Aktivierungskurven dieses Experiments zeigen, dass auch der für die Herstellung der Mutanten-Bibliothek verwendete *H. pylori* Stamm G27 eine Oszillation der NF- κ B-Antwort zeigt, die nach 90 min Infektion wieder ansteigt. Die maximale Aktivierung ist zwar niedriger als innerhalb der ersten 60 min, dennoch ist der erneute Anstieg deutlich zu erkennen. Die Aktivierungskurven beider Stämme unterscheiden sich nicht voneinander. Demzufolge ist die Oszillation demnach kein Stamm-spezifisches Phänomen. Um Mutanten identifizieren

zu können, die ein verändertes Oszillationsverhalten zeigen, wurde aufgrund dieses Experiments auch der Infektionszeitpunkt von 180 min als *Screening*-Analysezeitpunkt festgelegt.

5.2. Das Zufallsexperiment: Analyse von zehn zufällig ausgewählten Einzelklonen der Mutanten-Bibliothek

Vor der Durchführung eines genomweiten *Screens* ist es wichtig, mit der Hilfe eines kleineren Versuchsansatzes die Sensitivität und Spezifität der Methode zu charakterisieren. Hierfür wurden zehn Einzelklone der Transposon-Bibliothek in einem Zeitverlaufsexperiment auf ihre Fähigkeit überprüft, NF- κ B zu aktivieren (**Abb. 5.6**). Für die Analyse wurde die Reporterzelllinie AGS SIB02 in 96-Well Platten ausgesät und mit den jeweiligen Mutanten oder den Kontrollen G27 und G27 Δ cagE infiziert. Auch hier wurde ein 15 minütiges Zeitintervall gewählt. Die Infektion wurde nach 120 min Gesamtzeit abgestoppt.

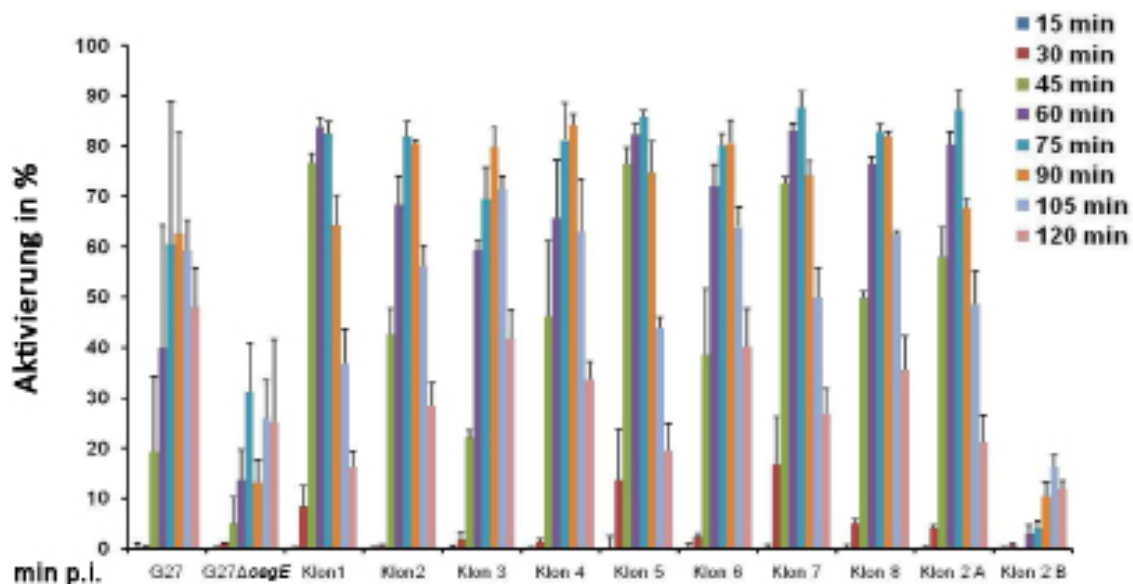


Abb. 5.6: Analyse von zehn zufällig ausgewählten Mutanten der *H. pylori* Bibliothek.

AGS SIB02 Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät und mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm G27, der Deletionsmutante G27 Δ cagE oder zehn zufällig ausgewählten Mutanten der *H. pylori* Transposon-Bibliothek infiziert (MOI 100). Die Infektion erfolgte in einem Zeitintervall von 15 min und wurde nach einer Gesamtzeit von 120 min abgestoppt. Die prozentuale Anzahl aktivierter Zellen pro Ansatz (Well) wurde mit einem automatischen Mikroskop und einer anschließenden Computeranalyse ermittelt (siehe Material und Methoden; S. 128-129). Die Standardabweichung wurde durch die Messung von Triplikaten ermittelt.

Einer der zehn zufällig ausgewählten Klone zeigte in allen Zeitpunkten der Infektion keine NF- κ B Aktivierung (Klon 2B). Demzufolge trägt dieser Klon eine Mutation in einem Gen, das für die NF- κ B Aktivierung essentiell ist und kann so als ein *Hit* betrachtet werden. Da schon innerhalb von zehn zufällig ausgewählten Klonen ein Treffer erzielt werden konnte, scheint die Methode demzufolge sensitiv und spezifisch genug zu sein, um bakterielle Proteine zu finden, die mit der Aktivierung von NF- κ B in Verbindung stehen.

Anhand einer Sequenzierung des Transposon-Insertionsorts von Klon 2B und einer anschließenden Sequenzanalyse konnte das Transposon in dem Gen *cagF* lokalisiert werden (siehe Material und Methoden; S. 130-131). *cagF* ist eines der Gene der Pathogenitätsinsel *cag*-

PAI, die für das T4SS kodiert. Interessanterweise gehört das Protein nicht zu den strukturellen Komponenten des T4SSs, sondern kodiert für ein Chaperon-ähnliches Molekül, das nahe an dem C-terminalen Sekretionssignal des Effektors CagA bindet und seine T4SS vermittelte Translokation ermöglicht (Pattis *et al.*, 2007). Da die Aktivierung der AGS SIB02 Zellen jedoch nicht CagA abhängig ist (Bartfeld *et al.*, in Vorbereitung) könnte die Identifizierung dieser Mutante darauf schließen lassen, dass ein bisher unbekanntes Effektor-Molekül durch die Hilfe des Chaperons CagF in die Wirtszellen gelangt.

5.3. Der Test-Screen unter Nutzung der automatisierten Roboter-Plattform

Nach der manuellen Etablierung der einzelnen Schritte wurde die Methode auf eine automatisierte Screening-Plattform transferiert und dort optimiert (siehe Material und Methoden; S. 131-132; Abb. 6.6). Durch die Durchführung eines kleinen Test-Screens wurde die in Abb. 6.6 beschriebene Screening-Methode angewendet und getestet. Hierbei kamen zwei Masterplatten im 96-Well Format (Familien; siehe Material und Methoden; S. 131-132; Abb. 6.6) zum Einsatz, die jeweils achtmal die Kontroll-Stämme Klon 2B (Positivkontrolle) und Klon 1 (Negativkontrolle) beinhalteten. Hinzu kamen 80 zufällig ausgewählte Klone der Mutanten-Bibliothek pro Platte. Da insgesamt zwei Masterplatten (Familie I und II) analysiert wurden, konnten so 160 Einzelklone der Mutanten-Bibliothek in einem Durchlauf untersucht werden. Die Mutanten wurden nach der Analyse mit Hilfe des Z-Scores (Abb. 6.7B) als potentielle Hits klassifiziert. Dieser gibt an wie stark der Messwert der einzelnen Klone von dem Mittelwert aller Messwerte eines Durchgangs abweicht (siehe Material und Methoden; S. 134).

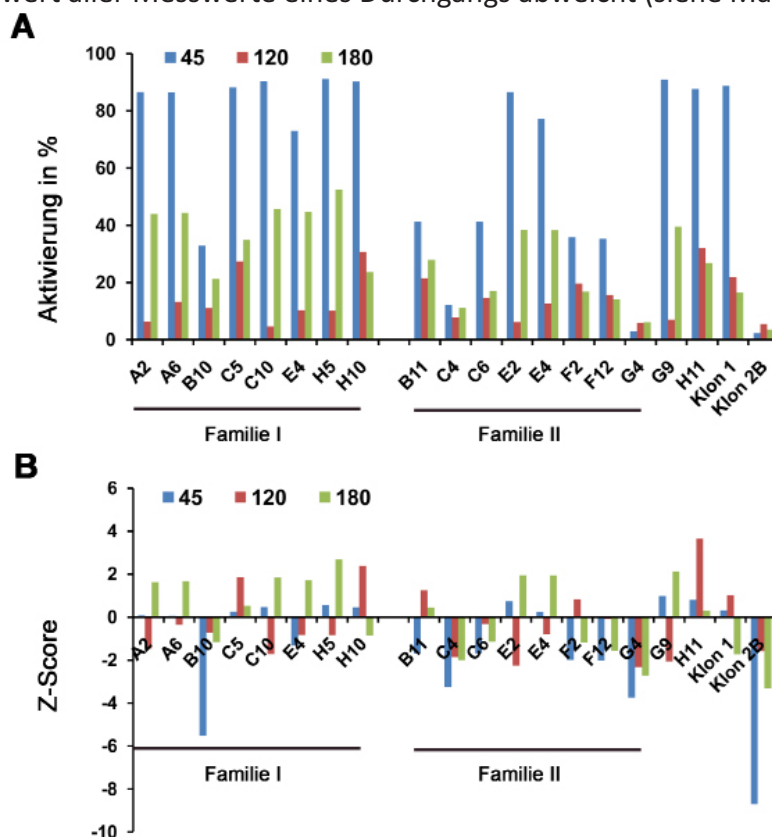


Abb. 5.7: Ergebnisse des Test-Screens.

Für den Test-Screen wurden zwei Masterplatten im 96-Well Format eingesetzt, die jeweils acht Einzelklone der Kontroll-Stämme Klon 2B und Klon 1 enthielten. Hinzu kamen 80 Einzelklone der Mutanten-Bibliothek pro Masterplatte. Der Test-Screen wurde wie in Abb. 5.6 beschrieben mit drei verschiedenen Infektionszeitpunkten (45 min, 120 min, 180 min) durchgeführt. Die Analyse der Reporter-Platten mit dem automatischen Mikroskop und die anschließende Computeranalyse lieferte sowohl die prozentuale Aktivierung der AGS SIB02 Zelllinie nach Infektion mit den Einzelklonen (A), als auch den korrespondierenden Z-Score (B). Die Standardabweichung wurde durch die Messung von Triplikaten ermittelt.

Für Mutanten, die als inhibitorisch eingestuft wurden, wurde ein Schwellenwert von -1 gewählt. Bei Mutanten, die in späteren Zeitpunkten eine höhere Aktivierung zeigten als die Negativkontrolle Klon 1, wurde der Schwellenwert bei 0,8 festgelegt. Zusätzlich wurden auch die Aktivierungsmuster für die Hitdetermination verwendet (Abb. 5.7A).

Während zwei Mutanten aus Familie II (G4 und C4) keine Aktivierung mehr zeigten, riefen drei weitere Mutanten nach 45 min eine reduzierte Aktivierung hervor (Familie I_B10; Familie II_B11 und C6). Alle anderen Mutanten, die als *Hits* definiert wurden, zeigten in den späteren Infektionszeitpunkten (120 und 180 min) eine höhere Aktivierung als die Negativkontrolle Klon 1. Insgesamt gingen aus diesem ersten Versuchsansatz 18 *Hits* hervor (Abb. 5.7), die in zwei weiteren Validierungsrunden nochmals überprüft wurden (Abb. 5.8 und 5.9).

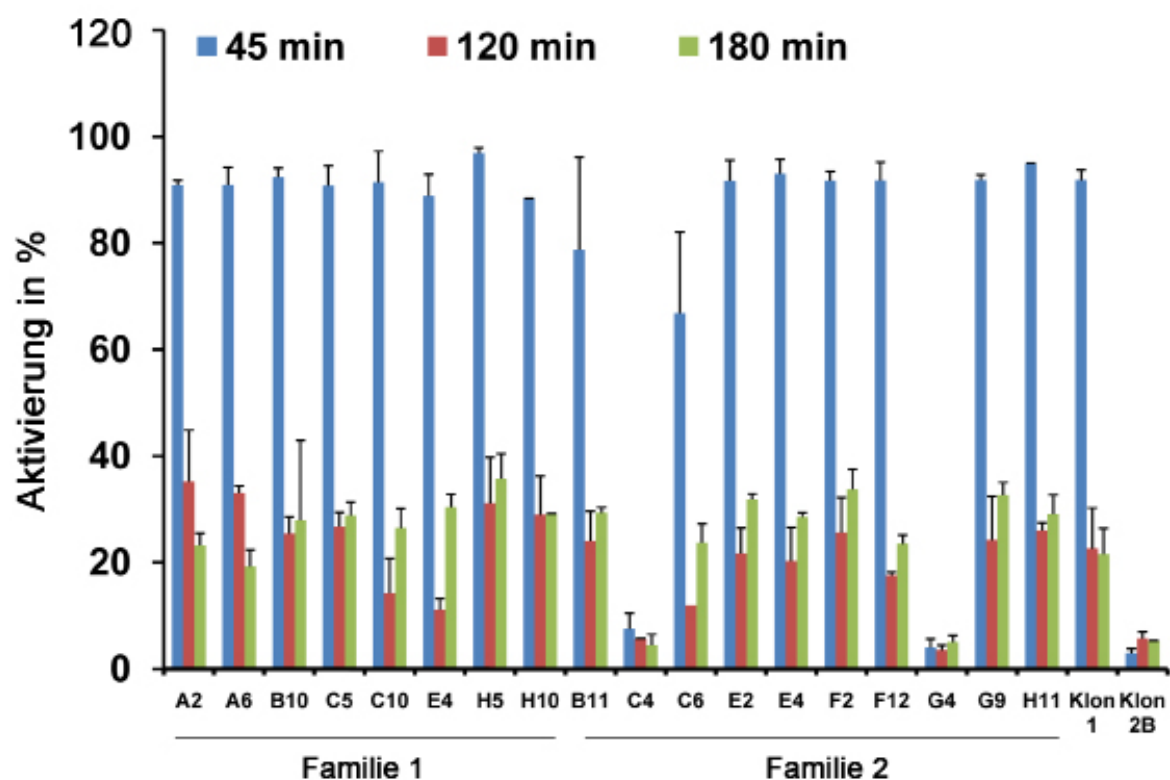


Abb. 5.8: Erste Validierungsrunde des Test-Screens.

Die 18 *Hits* der zwei Familien aus der vorhergehenden *Screening*-Runde wurden mit der gleichen Methode wie in Abb. 6.6 beschrieben auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. Als Kontrollen wurden erneut Klon 2B und Klon 1 eingesetzt. Die Analyse mit dem automatischen Mikroskop und die Auswertung mit dem Computer-Programm Scan^R lieferte die Anzahl der aktvierten AGS SIB02 Zellen in Prozent nach Infektion mit den verwendeten Einzelklonen. Die Standardabweichung wurde durch die Messung von Triplikaten ermittelt.

Für die Validierung wurden die *Hits* nach ihrer Rekultivierung wie in Abb. 6.6 beschrieben bearbeitet. Als Kontrollen wurden erneut Klon 2B und Klon 1 verwendet. Bei der Auswertung der Validierungsrunden wurde kein Z-Score benutzt, da sich der Mittelwert aufgrund der selektiv ausgesuchten *Hits* verfälscht und der Z-Score deshalb hier für die Klassifizierung der *Hits* hier ungeeignet ist. Es wurden nur die Aktivierungsmuster für die Validierung herangezogen. Die *Hits* wurden in doppelten Ansätzen auf je eine von zwei Masterplatten transferiert. So konnte die Standardabweichung berechnet werden. In der ersten Validie-

rungs-Runde konnten 11 der 18 *Hits* bestätigt werden (Abb. 5.8). Hiervon zeigten die meisten entweder eine leicht erhöhte NF- κ B Aktivierung zu späteren Zeitpunkten der Infektion (Fam I_A2, H5, B11; Fam II_E2, F2, G9) oder ein verändertes Oszillationsverhalten, das durch niedrigere Aktivierungswerte nach 120 min deutlich wird (Fam I_C10, E4 und Fam II_C6). Die beiden Mutanten C4 und G4 aus Familie II konnten klar als inhibitorische Klone bestätigt werden. Generell sind die Abweichungen in den Ansätzen, die eine Erhöhung oder ein verändertes Oszillationsverhalten zeigen, im Vergleich zu der Negativkontrolle Klon 1 nicht sehr groß. Dies lässt vermuten, dass die Wahrscheinlichkeit Proteine zu finden, die in längeren Infektionsperioden keine Verringerung der NF- κ B Antwort zeigen, ziemlich gering ist. Im Gegensatz dazu, ist die Chance Proteine zu identifizieren die die NF- κ B Aktivierung vermitteln, sehr hoch.

Von den zehn Klonen lieferten vier ein klares Ergebnis bezüglich ihrer Aktivierungskurven, die stark von denen des Kontroll-Stamms Klon 1 abwichen (Familie I_H5 und E4; Familie II_C4 und G4). Dennoch wurden acht der zehn bestätigten *Hits* in eine weitere Validierungs-Runde überführt, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen (Abb. 5.9).

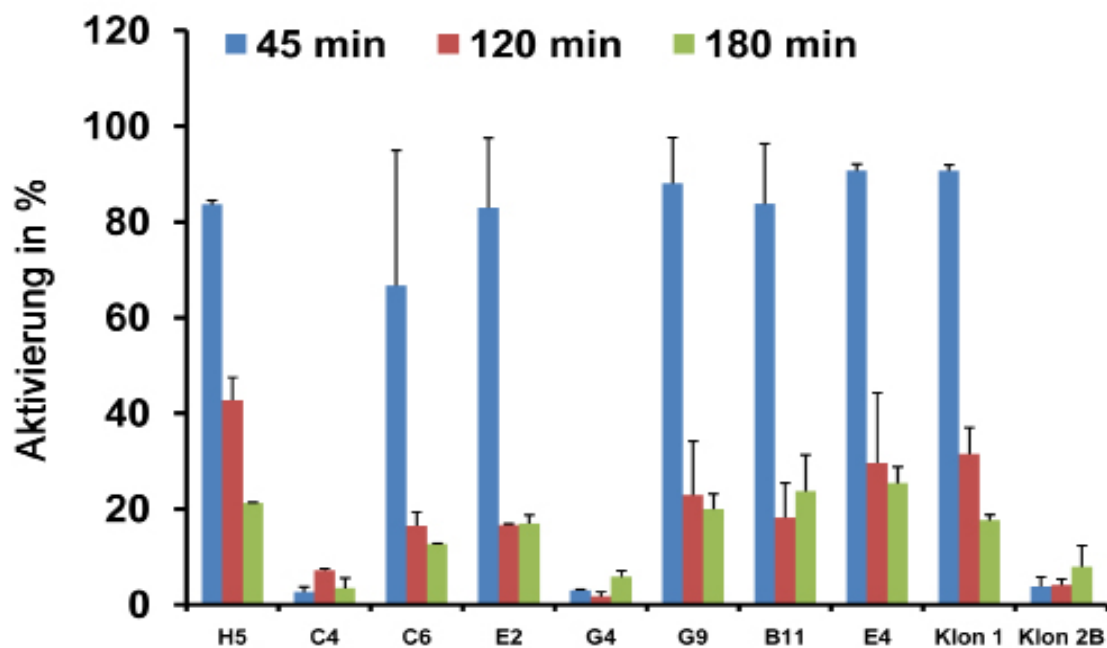


Abb. 5.9: Zweite Validierungsrunde des Test-Screens.

Acht *Hits* aus der vorhergehenden Validierungs-Runde wurden mit der gleichen Methode wie in Abb. 6.6 beschrieben überprüft. Als Kontrollen wurden Klon 2B und Klon 1 eingesetzt. Die prozentuale Anzahl der aktivierten AGS SIB02 Zellen nach der Infektion mit den verwendeten Einzelklonen wurde mit dem automatischen Mikroskop und dem Computer-Programm Scan^R ermittelt. Die Standardabweichung wurde durch die Messung von Triplikaten ermittelt.

Hierbei zeigte sich, dass drei Hits der vorherigen Validierungsrunde nochmals bestätigt werden konnten (Klon H5, Klon C4 und Klon G4). Die abweichenden Ergebnisse zwischen der ersten und den darauf folgenden Runden unterstreicht die Wichtigkeit der *Screen*-Validierung, die es ermöglicht falsch-positive Ergebnisse effektiv auszuschließen. Die Schwankungen sind für sensible biologische Systeme zu erwarten in denen zwei Parameter (Wirtszelle; Bakterium) aufeinander abgestimmt werden müssen. Sie können u.a. darauf zurückgeführt werden,

dass die Aktivierungsmuster sehr stark von der bakteriellen Fitness abhängen. Durch das mehrfache Passagieren der Bakterien während den Validierungsrunden können sich diese verändern und die vorherigen Ergebnisse verfälschen. Zusammenfassend konnten von 160 eingesetzten Einzelklonen drei Mutanten als *Hits* identifiziert werden.

Die Sequenzierung des Transposon-Lokus der Klone C4 und G4 ergab, dass es sich hierbei um Mutanten handelt, bei denen das Transposon in dem Gen *cag7* lokalisiert ist. *cag7* kodiert für eine ATPase, die essentiell für die Integrität des T4SSs ist. Die Mutanten sind nicht identisch, da sich der Insertionsort der Transposons unterscheidet. Während das Transposon in der Mutante G4 am 5' Ende des Gens sitzt, inserierte es bei der Mutante C4 in der Mitte des Gens. Die Mutante Klon H5, die zu späteren Infektionszeitpunkten immer ein leicht höheres Aktivierungsmuster als die Positivkontrollen zeigte, trägt ihre Mutation in dem Gen eines hypothetischen Proteins, für das es noch keine funktionalen Analysen gibt. Die Sequenz zeigt Homologien zu einer Phosphat N-Acetylglucosaminyltransferase.

5.4. Der Screen

Der Haupt-Screen wurde mit 2640 Einzelklonen der Mutanten-Bibliothek durchgeführt. Da aufgrund der semiautomatischen Durchführung nicht alle Klone zeitgleich bearbeitet werden können, wurden drei unabhängige *Screening*-Runden durchgeführt. Die erste Runde umfasste zehn Familien, die zweite und die dritte Runde wurden mit jeweils 11 Familien durchgeführt.

Pro Familie wurden jeweils acht Einzelklone der Kontroll-Stämme Klon 2B (Positivkontrolle), Klon 1 und G27 (Negativkontrollen) eingesetzt. Die *Screening*-Runden wurden wie in **Abb. 6.6** beschrieben durchgeführt und analysiert. Die Tabellen wurden anschließend mit dem Statistik-Programm „R“ weiter verarbeitet, das die Aktivierungsdiagramme (**Abb. 5.10A**), die Z-Scorediagramme (**Abb. 5.10B**) und die farblich kodierte Aktivungsverteilung der jeweiligen 96-Well Platten (**Abb. 5.10C**) erstellt. So erhält man einen schnellen Überblick über die *Screening*-Ergebnisse. In **Abb. 5.10** sind die Resultate einer repräsentativen Platte dargestellt.

Das Z-Score Diagramm verdeutlicht, dass insgesamt fünf inhibitorische Mutanten auf der Platte zu finden sind, die keine NF- κ B Aktivierung mehr zeigen (**Abb. 5.10B**). Die Aktivierungsintensitäten der Masterplatten zeigen eine zufällige Verteilung der *Hits* auf der Platte, was für die Signifikanz der erhaltenen Daten spricht, da keine Positionseffekte zu erkennen sind (**Abb. 5.10C**).

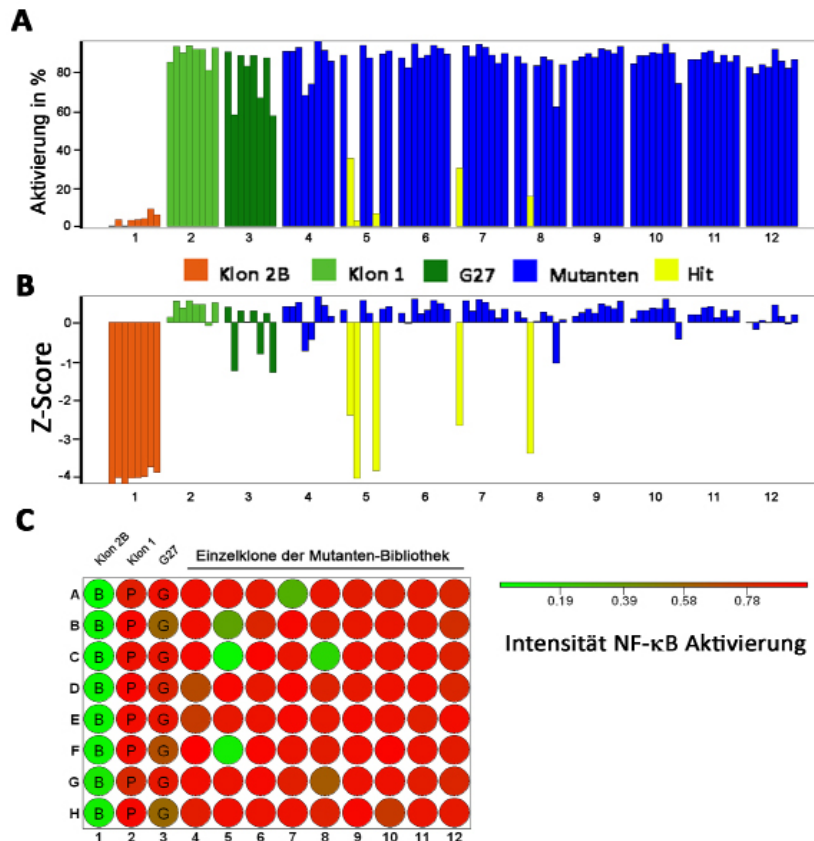


Abb. 5.10: Ergebnisse der Analyse einer repräsentativen Masterplatte (Familie) aus dem Haupt-Screen nach 45 min Infektion.

2640 Einzelklone der Mutanten-Bibliothek wurden in drei unabhängigen Screening-Runden auf ihre Fähigkeit getestet, NF-κB zu aktivieren. Hierfür wurde die Methode aus Abb. 6.6 angewendet. Aus dem Screen gingen 579 Hits hervor, die anhand einer Auswertung mit dem Statistik-Programm „R“ ermittelt wurden. A) Aktivierungsdiagramme der Einzelklone einer Familie. Als Kontroll-Stämme wurden der Klon 2B (orange), Klon 1 (hellgrün) und G27 (dunkelgrün) eingesetzt. Die Mutanten sind blau gekennzeichnet. Aus der Masterplatte hervorgehende Hits sind mit gelben Balken markiert. B) Das korrespondierende Z-

Score-Diagramm zeigt an, um wieviele Standardabweichungen der beobachtete Wert (Hits) vom Mittelwert der Gesamtmessung einer Platte abweicht (Kontrollen ausgenommen). C) Die Platten-Matrix spiegelt die Verteilung der Aktivierungsintensitäten pro Well wieder. In grün markierten Wells wurde keine oder nur eine geringe Aktivierung beobachtet; rote Wells beinhalten Zellen mit einer hohen Aktivierungsquote.

Mit Hilfe des Programms wurde außerdem der sog. Z'Faktor ermittelt (siehe Material und Methoden; S. 132). Er gibt die Qualität eines Screens an, indem die Summe der Standardabweichungen aller Kontrollen durch die Mittelwertbereich der Kontrollen dividiert wird. So erhält man einen Einblick in die Brauchbarkeit der Kontrollen, deren Messwerte im Vergleich zu den Proben signifikant auseinander liegen sollten. Dementsprechend liegt das Ergebnis bei gut gewählten Kontrollen immer unter dem Wert 1. In Abbildung Abb. 5.11 ist der Z'Faktor für die repräsentative Masterplatte des durchgeführten Screens dargestellt, die auch in Abb. 5.10 zu sehen ist. Da der Z'Faktor bei allen Masterplatten des Screens zwischen 0,7 und 0,8 liegt spricht das Ergebnis für einen qualitativ hochwertigen Screen.

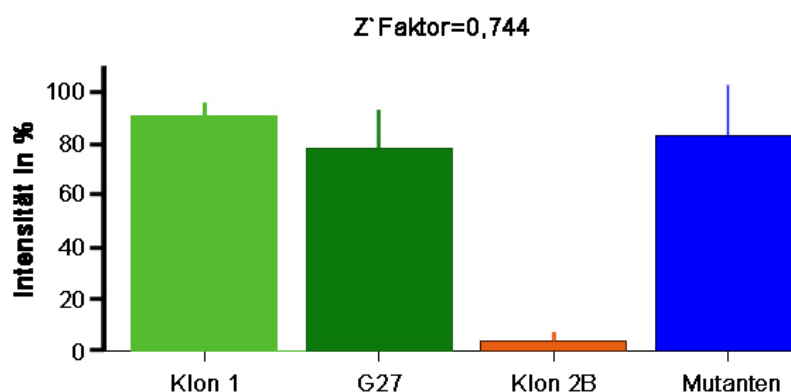


Abb. 5.11: Z'Faktor und Mittelwert der verwendeten Kontrollen.

Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der jeweiligen Ansätze (Kontrollen und Mutanten) auf der repräsentativen Platte aus Abb. 4.10. Außerdem ist der ermittelte Z'Faktor der Kontrollen dargestellt.

Insgesamt konnten in dem bakteriellen Screen nach der ersten Runde 579 Mutanten als *Hits* klassifiziert werden, die nun durch zwei unabhängigen Validierungsrunden nochmals getestet und bestätigt werden. Hier konnten sowohl NF- κ B inhibierende (263) als auch NF- κ B aktivierende Mutanten (187) gefunden werden, die zu späteren Infektionszeitpunkten ein höheres Aktivierungsmuster zeigten als die Kontrollstämme. Die Chancen sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren der T4SS induzierten NF- κ B Aktivierung zu entdecken sind demnach sehr hoch. Alle anderen Mutanten zeigten im Vergleich zu der Negativkontrolle veränderte Oszillationskurven der NF- κ B Antwort (z.B. späterer Aktivierungspeak), was dafür spricht, dass ebenfalls Mutationen in Genen entdeckt werden können, die wichtig für den Aufbau der Flagellen von *H. pylori* sind. Den Ergebnissen des Test-Screens zur Folge kann man eine tatsächliche *Hit*-Anzahl zwischen 50 und 60 Mutanten erwarten. Diese Mutanten sollen mit unterschiedlichen Versuchsansätzen auf verschiedene Charakteristika (Integrität des TFSSs, Adhäsion, Zellform) untersucht werden. Anhand der so gewonnen Erkenntnisse soll ein umfassendes Modell der T4SS abhängigen NF- κ B Aktivierung erstellt werden, das das Verständnis der *H. pylori* induzierten Pathogenese vertieft. Die Daten sollen außerdem dazu beitragen neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können, die gezielter in pathogene Prozesse eingreifen als herkömmliche Strategien.

5.5. Diskussion Ergebnisteil 4

5.5.1. Der klassische genetische *Screen*

Kombiniert man Methoden der Reversen Genetik mit Hochdurchsatz-Analysen, eröffnen sich fundamentale Möglichkeiten die Funktion von Genen global zu analysieren. Während populäre RNAi *Screens* Proteinfunktionen und Proteinnetzwerke in eukaryotischen Zellen identifizieren, fokussiert sich der hier verwendete klassische *Screen* auf die Aufklärung eines prokaryotischen Systems. Die Voraussetzungen und Ziele sind in beiden Systemen sehr ähnlich. Sie haben jedoch auch mit unterschiedlichen Nachteilen zu kämpfen.

Beide Methoden basieren auf einem klar definierten und einfach auszuwertenden Phänotyp, dessen Ausprägung durch den Einsatz von siRNA Molekülen oder Mutanten getestet wird. Im Vergleich zu RNAi *Screens* ist die Identifikation der entsprechenden Mutationen jedoch bei klassischen *Screens* häufig sehr zeitaufwendig. Hinzu kommt, dass besonders Transposon-generierte Mutationen unkontrollierbaren Tendenzen unterliegen, die eine hundertprozentige Abdeckung des Genoms unmöglich machen. Aber auch RNAi *Screens* haben ihre Nachteile. Oft variiert die Intensität der Proteinexpressions-Inhibierung und sog. *Off target*¹ Effekte erhöhen die Wahrscheinlichkeit eine große Anzahl an falsch-positiven *Hits* zu identifizieren. Durch die Kombination beider Methoden könnten die Vorteile beider Methoden genutzt werden, die die jeweiligen Nachteile in den Hintergrund rücken lassen.

Da RNAi *Screens* aufgrund des fehlenden RNAi Mechanismus in Prokaryonten, für die Analyse prokaryotische Faktoren ungeeignet sind, wurde hier eine klassische *Screening*-Methode verwendet. Der *Screen* ermöglicht die Identifikation einer Vielzahl an bakteriellen Faktoren, die mit der T4SS induzierten NF- κ B Antwort der Wirtszelle assoziiert sind. Dies ist deshalb besonders interessant, da das T4SS von *H. pylori* zu den wichtigsten Virulenzfaktoren des Bakteriums gehört. Durch die Aktivierung von NF- κ B verursacht es eine chronische Inflammation und begünstigt so die Entstehung von Magenkrebs und Magengeschwüren.

Die Kombination der gewonnenen Daten dieser Methode, mit den Ergebnissen eines genomweiten RNAi *Screens*, der es ermöglicht Wirtszelldeterminanten zu finden, könnte ein globales Modell generiert werden, das beide Seiten der Wirt-Pathogen-Interaktion beleuchtet. Die Erkenntnisse würden das Verständnis der *H. pylori* induzierten Pathogenese enorm vergrößern und neue wissenschaftliche Forschungsbereiche entstehen lassen.

5.5.2. Ziele und Möglichkeiten des *H. pylori* *Screens*

Eine der spannendsten Möglichkeiten dieses *Screens* liegt darin, neue Effektoren identifizieren zu können, die durch das T4SS in die Wirtszelle transloziert werden. Hinzu kommt, dass

¹ *Off target* Effekt: die Veränderungen des Phänotyps zeigen sich nicht aufgrund der Runterregulation eines spezifischen Proteins, sondern sind vielmehr das Ergebnis von Auswirkungen der siRNA auf die Expression mehrerer Proteine

durch die Analyse von frühen und späten Zeitpunkten der Infektion sowohl NF- κ B Aktivatoren als auch NF- κ B Inhibitoren gefunden werden können. Dass Inhibitoren existieren ist nicht auszuschließen, da gezeigt werden konnte, dass primäre Infektionen mit *H. pylori* eine zweite Pathogen-induzierte NF- κ B Aktivierung unterdrücken. Dies kann nicht auf einen generellen inhibitorischen Effekt der Signalkaskade zurückgeführt werden, da die Stimulation mit TNF α die NF- κ B Antwort nach einer *H. pylori* Infektion wieder induzieren kann (Bartfeld *et al.*, in Vorbereitung). Da bisher nur CagA als translozierter Effektor bekannt ist, konzentriert sich ein Großteil der *H. pylori* Forschung auf dieses Protein. Häufig wird dabei vergessen, dass es noch andere Induktoren für beobachtete Effekte geben könnte. Die Entdeckung von neuen translozierten Effektoren würde die Entwicklung von neuen Hypothesen ermöglichen und der Forschung einen größeren Spielraum gewähren.

Ein anderer Vorteil dieses *Screens* liegt in der potentiellen Aufdeckung von bisher unbekannten T4SS Komponenten. Hierzu können z.B. Hilfsproteine gezählt werden, die an dem Aufbau des T4SSs beteiligt sind. Es liegt nahe, dass Transportproteine oder Chaperone benötigt werden, die Komponenten des T4SSs in den periplasmatischen Raum überführen. Aber auch Transkriptionsfaktoren, die die Synthese des T4SSs einleiten, gehören dazu. Interessant wäre auch die Identifikation von Faktoren, die für die Lokalisation des T4SSs verantwortlich sind. Neueste, unveröffentlichte Ergebnisse (T4SS Workshop, Spanien 2008) lassen vermuten, dass die polare Lokalisation des T4SSs von *Legionella pneumophila* entscheidend an der Sekretion von Effektoren mitwirkt. Ähnliche Vorgänge konnten bisher bei *H. pylori* noch nicht gefunden werden, es spricht aber auch nichts gegen die Existenz solcher Kontrollmechanismen.

Darüber hinaus können mit dieser *Screening*-Methode auch bakterielle Adhäsine entdeckt werden, die für die Induktion T4SS abhängiger Wirtzellantworten benötigt werden. Für eine erfolgreiche Translokation von Effektoren muss *H. pylori* an den Wirtszellen adhärieren. Eine erfolgreiche Adhäsion ist eine Voraussetzung für die Kolonisierung der Bakterien und essentielle Adhäsionsstrukturen, könnten wichtige Ziele für therapeutische Ansätze sein.

Auch andere wichtige Virulenzfaktoren wie Komponenten des Flagellenapparats können, durch die Analyse späterer Zeitpunkte in diesem *Screen* entdeckt werden. Bakterien, die sich nicht mehr fortbewegen können erreichen die Zellen sehr viel später. Mutanten dieser Art würden eine veränderte Oszillationskurve der NF- κ B Aktivierung zeigen und demzufolge ebenfalls in das Ausleseraster fallen.

5.5.3. Gedanken zum *Read-Out* System

Die Vielzahl an möglichen Entdeckungen macht deutlich, wie sinnvoll Hochdurchsatz-Analysen sind, deren Durchführung die Identifikation einer großen Anzahl bakterielle Virulenzfaktoren erlaubt. Die Etablierung eines genomweiten *Screens* setzt jedoch den Einsatz eines robusten Auslesemechanismus (*Read-Out*) und eine leichte Durchführbarkeit voraus, die möglichst wenig Schritte beinhaltet. Für diesen Screen wurde deshalb die einfach zu analy-

sierende nukleare Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 gewählt. Dennoch muss hier berücksichtigt werden, dass der Begriff NF- κ B eine Familie von Transkriptionsfaktoren umfasst, die aus mehreren Untereinheiten (p50, p100, p52, p65) besteht und als Hetero- oder Homodimere agieren können (Rushlow und Warrior, 1992). Demzufolge werden *H. pylori* induzierte NF- κ B Antworten, die Untereinheiten wie z.B. p50 miteinbeziehen, in dieser Methode nicht berücksichtigt. Die NF- κ B Untereinheit p50 scheint aber bei *H. pylori* Infektionen eine große Rolle zu spielen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass p50 als Homodimer an den Promotor des Gens der H,K-ATPase α Untereinheit bindet und so die Expression des Gens inhibiert (Saha *et al.*, 2008). Da die H,K-ATPase in Parietalzellen die Säuresekretion kontrolliert, hat diese Repression große Einflüsse auf den pH-Wert der Magensäure und ist eine mögliche Erklärung für die *H. pylori* induzierte Hypochlorhydria¹.

Untersuchungen mit dem verwandten *Helicobacter* Stamm *Helicobacter hepaticus* haben außerdem gezeigt, dass das NF- κ B-Heterodimer p50/p100 eine wichtige Rolle in dem IL-10 vermittelten Schutz vor *H. hepaticus* induzierter Colitis spielt (Tomczak *et al.*, 2006). Demzufolge sind auch andere Untereinheiten der NF- κ B Familie an bakteriell induzierten inflammatorischen Prozessen beteiligt. Da p65 jedoch einer der Hauptmediatoren für die Expression proinflammatorischer Gene ist, bietet die hier entwickelte Methode dennoch die Möglichkeit, in Zukunft wichtige Fragen zur *H. pylori* induzierten Pathophysiologie zu betrachten, die eng mit der Induktion einer chronischen Inflammation assoziiert sind.

Die Ergebnisse des Test-Screens haben bereits zu einer interessanten Entdeckung geführt. Hier konnte das Protein CagF als wichtiger Mediator für die T4SS vermittelte NF- κ B Aktivierung identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um ein Chaperon, das die Translokation von CagA vermittelt (Pattis *et al.*, 2007). Da aber CagA in dem verwendeten Read-Out System keinen Einfluss auf die NF- κ B Aktivierung hat (Bartfeld *et al.*, in Vorbereitung), könnte man daraus schließen, dass CagF hier die Translokation eines bisher unbekannten NF- κ B Effektors oder die Translokation von Peptidoglycan einleitet.

Darüber hinaus konnte eine Mutante entdeckt werden, die zu späteren Infektionszeitpunkten eine höhere Aktivierung zeigt als der verwendete Wildtyp-Stamm. Homologie-Vergleiche machen deutlich, dass das Transposon dieser Mutante in einem noch unbekannten Gen liegt, welches Homologien zu einem Gen aufweist, das für die Phosphat N-Acetylglucosaminyltransferase kodiert. N-Acetylglucosaminyltransferasen spielen eine wichtige Rolle in der Biofilm-Formation des gram positiven Bakteriums *Staphylococcus epidermidis* (Gerke *et al.*, 1998). Warum eine Mutation dieses Gens zu einer Erhöhung der NF- κ B Aktivierung führen kann ist noch nicht geklärt und muss noch analysiert werden.

1 Hypochlorhydria: Status in dem der Magen nicht mehr genügend Magensäure (*hydrochloric acid*) produziert.

5.5.4. Schlusswort

Mit dem hier entwickelten *Screen* konnten bereits 2640 Einzelklone der Transposon-Bibliothek getestet werden, von denen 579 potentielle *Hits* in zwei weiteren unabhängigen Validierungsrunden nochmals überprüft werden. Anschließende Analyse-Methoden wie die Überprüfung der Integrität des T4SSs, Elektronenmikroskopische Analysen und Adhärenz-Tests sollen eine detaillierte Charakterisierung der Mutanten ermöglichen. Nach den Ergebnissen des Test-Screens ist eine große Anzahl interessanter *Hits* zu erwarten, die nach eingehender Analyse drei großen Virulenzfaktor-Gruppen von *H. pylori* zugeordnet werden können. Sie sollen das *H. pylori* Infektionsmodel erweitern und neue spannende Forschungsansätze liefern.

6. Material und Methoden

6.1. Allgemeine DNA-Arbeitstechniken

6.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

Die transformierten Bakterienstämme wurden über Nacht in 25-50 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) mit geeigneten Antibiotikazusätzen bei 37°C und 250 rpm schüttelnd inkubiert. Die Aufreinigung der durch die Bakterien amplifizierten Plasmide erfolgte nach den Angaben des Herstellers des Plasmid-Midi-Kits von Qiagen. Da das Endotoxin von *E. coli* für Lentiviren, die für die Herstellung stabiler shRNA Zellen eingesetzt werden, toxisch ist, wurden die Plasmide für die Herstellung der Lentiviren mit dem *Endotoxinfree* DNA-Midipräparationskit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Sowohl die Quantität als auch die Reinheit der gewonnenen DNA wurde photometrisch bestimmt ($1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ ds DNA). Die Plasmide wurden in 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

6.1.2. Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Um die verwendeten Plasmide zu amplifizieren, wurden sie in *E. coli*-Zellen transformiert. Die Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien erfolgte nach Angaben des Herstellers des *E. coli* Stamms: F- *deoR endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) phoA supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argF)U169 Φ80ΔlacZΔm15* von Bioline. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 30 min mit 1 μg Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu steigern, wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt. Hierfür wurden sie 95 sec auf 42°C überführt und abschließend nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Transformation wurden die Bakterien in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium aufgenommen und 1-1,5 h bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Von dem Ansatz wurden 100 und 900 μl auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde ein Klon gepickt und in Flüssigmedium ü.N. schüttelnd (200 rpm) bei 37°C vervielfältigt. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkultur für die Präparation von DNA verwendet und ein Gefrierstock angelegt. Für die Lagerung bei -80°C wurde die bakterielle Lösung mit 20% Glycerol versetzt.

Nährmedien und Medienzusätze für *E. coli*

LB-Medium	
Bacto-Trypton (Difco)	10 g
Hefextrakt (Difco)	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1 L

Agarplatten	
LB-Medium	mit 1,5% Agar (Difco)
je nach Plasmid folgende Antibiotika zusetzen:	
Ampicillin	100 µg/L
Kanamycin	25 µg/L

Einfriermedium	
LB-Medium	mit 20 % Glycerol

6.2. Material und allgemeine Methoden für eukaryotische Zellen

6.2.1. Zelllinien

Name	Zelltyp	Quelle	Medium
AGS	humane gastrische Adenokarzinom-Epithelzelllinie	ATCC: CRL 1739	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
CHO K1	Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters	ATCC: CCL 61	MEM alpha (Gibco BRL), 10% FBS
Cos1	Nierenzellen der grünen Meerkatze	ATCC: CRL 1650	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
GLC4	humane Lungenkarzinom-Zelllinie	Zijlstra <i>et al.</i> , 1987	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% heat inactivated FBS, 2 mM L-glutamine
Hec.1b	humane Lungenkarzinom-Zelllinie	ATCC: HTP 113	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
HL	Humane Lungenzelllinie (Fibroblasten-ähnlich)	ECACC: 96121720	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
Hela	Humane Cervixkarzinom-Epithelzelllinie	ATCC: CCL 2	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
HepG2	Humane Hepatozyten-Karzinomzelllinie	ATCC: HB 8065	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
HT29	Humane Kolon-Karzinomzelllinie	ATCC: HTB 38	Mc Coy's 5A (Gibco BRL), 10% FBS

Name	Zelltyp	Quelle	Medium
J774.A	Monozytische Makrophagen-Zelllinie der Maus	DSMZ: ACC 170	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% heat inactivated FBS, 2 mM L-glutamine
Kato3	Humane gastrische Karzinom-zelllinie	ATCC: HTB 103	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% heat inactivated FBS, 2 mM L-glutamine
L929	Maus-Fibroblasten	ATCC: CCL 1	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
MDCK	Nierenzellen des Hundes	ATCC: CCL 34	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine
MKN-28	humane gastrische Adenokarzinom-Epithelzelllinie	Naito <i>et al.</i> , 1984	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% heat inactivated FBS, 2 mM L-glutamine
MKN-45	humane gastrische Adenokarzinom-Epithelzelllinie	DSMZ: ACC 409	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% heat inactivated FBS, 2 mM L-glutamine
SR4987	Stromal Fibroblasten-ähnliche Zelllinie der Maus	DSMZ: ACC 323	Mc Coy's 5A (Gibco BRL), 10% FBS
SYF + src	Maus-Fibroblasten (exprimieren Src)	ATCC: CRL 2498	DMEM (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM NaPyruvate
THP-1	Humane monozytischen Zelllinie (akute monozytische Leukämie-Zelllinie)	ATCC: TIB 202	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% heat inactivated FBS, 2 mM L-glutamine
293T	humane embryonale Nieren-zelllinie	ATCC: CRL 11268	DMEM (Gibco BRL), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 2 mM L-glutamine, 1 mM NaPyruvate

ATCC: American Tissue Culture Collection (www.atcc.org); **DSMZ:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (www.dsmz.de); **ECACC:** European Collection of Cell Cultures (www.ecacc.org.uk)

6.2.2. Kultivierung

Alle eukaryotischen Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (TPP) unter Verwendung des entsprechenden Mediums bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Die Passage erfolgte in einem regelmäßigen Zeitintervall von 2 Tagen. Hierfür wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden erneut in frischem Medium aufgenommen und in einem der Zelllinie entsprechenden Verhältnis verdünnt weiterkultiviert. Um Passage-abhängige Sekundäreffekte zu vermeiden, wurden die Zelllinien nach der 20 ten Passage entsorgt.

6.2.3. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Für die Konservierung wurden mind. 1×10^6 Zellen trypsiniert und in einer Tischzentrifuge bei 800 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO (v/v) in jeweiligem Zellkulturmedium aufgenommen. Die Lösung wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen (Nunc) überführt und eine Nacht bei -80°C in einem Styroporbehälter eingefroren. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.2.4. Auftauen und Rekultivierung von eukaryotischen Zellen

Eingefrorene Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden sie in einer Tischzentrifuge bei 800 rpm abzentrifugiert und das Pellet in dem jeweiligen Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden schließlich in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche überführt und eine Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt.

6.2.5. EGF und HGF Stimulation

20 Stunden vor der Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurden die Zellen auf nährstoffarmes Medium überführt (Zellkulturmedium ohne FCS). Für den Versuch wurden die entsprechenden Ansätze jeweils mit 100 ng/ml EGF (*epidermal growth factor*; SIGMA), 100 ng/ml HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*, SIGMA) oder 100 ng/ml HGF (*hepatocyte growth factor*; SIGMA) inkubiert.

6.2.6. Inhibitor-Behandlung

AGS Zellen wurden 2 h vor der Infektion unter serumfreien Bedingungen mit $10\text{ }\mu\text{M}$ STI (Imatinib, LC laboratories) inkubiert. Da die Wirkung des c-Abl Inhibitors reversibel ist, wurde er während der Infektion nicht entfernt.

6.2.7. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA

Für die transiente Überexpression plasmidkodierter Gene wurden adhärente eukaryotische Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) behandelt. Für jeden Ansatz wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. 2 μg Plasmid-DNA und 2 μl Lipofectamin wurden in 50 μl Optimem (Gibco) getrennt 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Lösun-

gen miteinander vereinigt. Für die liposomale Komplexformation wurde der Ansatz 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zusammen mit dem Transfektionsansatz in 900 µl Opti-mem überführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Transfektionsmedium durch frisches FCS (10%) haltiges Medium ersetzt. Für Kontrollversuche wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt, es wurde aber keine DNA eingesetzt (Mock). Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen für die entsprechenden Experimente eingesetzt.

Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Literatur	Stammsammlung
EGFR-WT	EGFR Wildtyp	Tanos <i>et al.</i> , 2006	H3806
EGFR Y1173F	EGFR Mutante	Tanos <i>et al.</i> , 2006	H3805
c-src WT	c-src Wildtyp	Broome und Hunter., 1996	L99
srcY529F	c-Src Mutante (konstitutiv aktiv)	Broome und Hunter., 1996	L101
CagA WT	Wildtyp-CagA	Higashi <i>et al.</i> , 2002	L345
CagA PR	Phosphorylierungsresistentes CagA	Higashi <i>et al.</i> , 2002	L346

6.2.8. Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNAs

Für die gezielte Hemmung der Expression bestimmter Proteine wurde die RNA Interferenz (RNAi) eingesetzt. Die Methode beruht auf einer Spaltung von dsRNA zu kleinen 21-25 nt langen Fragmenten durch das Enzym DICER, eine RNase III ähnliche Nuklease. Die so entstandenen Moleküle werden als „*small interfering*“ RNA (siRNA) bezeichnet. Der sense Strang der siRNA Fragmente lagert sich im sogenannten RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) an die Ziel-mRNA des jeweiligen Gens, dessen Produktsynthese inhibiert werden soll. Es kommt zu einer Spaltung und damit zu einem gezielten Abbau der mRNA durch den RISC Komplex. Die gezielte Inhibierung der Genexpression wird demnach *in vitro* durch die Zuführung genspezifischer siRNA-Moleküle ausgelöst.

Für die Transfektion wurden jeweils 1 x 10⁶ Zellen pro Ansatz verwendet. 10 µl siRNA (20 µM Stocklösung) wurden in 240 µl ECR-Puffer (Qiagen) 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 15 µl RNAifect (Qiagen) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Hierfür wurden die Zellen mit dem Transfektionsgemisch in 700 µl FCS (10%) haltiges Medium überführt. Nach 5 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die Ansätze geteilt und neu ausgesät. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen für Experimente eingesetzt, da die Intensität der Protein-Runterregulation nach drei Tagen am stärksten ist.

Name	siRNA Sequenz	Zielprotein
Luci	5`AACUUACGCUGAGUACUUCGA 3`	Luciferase
c-Abl ntr1	5`AACGGCUGAUGUGGACUGUCU 3`	c-Abl
EGFR 3`UTR	5`CCCTGTCTTGCTGTCATGAAA 3`	EGFR
SHP-2-1	5`AAGGUGGUUUC AUGGACAUCU 3`	SHP-2

6.2.9. Herstellung stabiler „knock-down“ Zelllinien

Für die Herstellung von Zelllinien in denen die Expression eines Gens stabil, d.h. dauerhaft verringert ist, werden durch Lentiviren eingeschleuste shRNA Sequenzen verwendet, die sich stabil in das eukaryotische Genom integrieren. Der Name shRNA kommt von „*small hair-pin*“ RNA und basiert auf einer Sequenzkomplementarität innerhalb des Moleküls, die zu einer Ausbildung einer Haarnadelstruktur führt. Durch den Mechanismus der RNA Interferenz (siehe S. 113) wird die Expression des betroffenen Proteins inhibiert. Die shRNAs für die Herstellung stabiler „knock down“ Zelllinien wurden bei Metabion mit dem BLOCK-iTTM RNAi Design Programm generiert (siehe unten). Die Sequenzen wurden in den lentiviralen Vektor pLVTHM kloniert. Durch den auf dem Plasmid kodierten Selektionsmarker GFP („*green fluorescent protein*“) kann sowohl die Virusinfektion als auch die Virusproduktion mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop überprüft werden. Die Herstellung der Lentiviren erfolgte durch die Kotransfektion der jeweiligen pLVTHM shRNA-Konstrukte (10 µg) mit den viralen Verpackungs-Vektoren psPAX2 (7,5 µg) und pMD2G (2,5 µg) in 293T Zellen unter Zugabe von Kalziumphosphat (0,5 M Endkonzentration). Hierfür wurde die DNA in 250 µl Tris-HCL (pH 7,6) aufgenommen und mit 250 µl Kalziumphosphat unter Zugabe von 0,5 µl HBS-Puffer 35 bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen überführt. Der viruspartikelhaltige Überstand wird 48 h nach der Transfektion auf AGS Zellen unter Zugabe von Polybren (5 µg/ml) überführt. Sieben Tage nach der Infektion wurden die Zellen subkultiviert. Die Auswirkungen der shRNA-vermittelten Hemmung der Proteinexpression wurden mittels Immunoblot analysiert (siehe S. 122-124). Die Zelllinien wurden vor ihrem Gebrauch nicht vereinzelt, um klonale Effekte zu vermeiden. Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-glutamine Medium kultiviert.

shRNA Sequenzen zur Herstellung der lentiviralen Vektoren

Name	shRNA Sequenz	Stamm-samm-lung	Zielprotein	Zelllinie
AGS EGFR-10	5`GCATTCCTTTGTCTCAAAC 3`	H3855	EGFR	AGS BB 003
AGS EGFR-11	5`GCAAGAATATTGTCCCTTTGA 3`	H3856	EGFR	AGS BB 004
AGS EGFR-12	5`GGAATTCTCTTAGACTTAC 3`	H3857	EGFR	AGS BB 005
AGS EGFR-Luci	5`AACTTACGCTGAGTACTTCGA 3`	H3858	Luciferase	AGS BB 007

Plasmide zur Herstellung der Lentiviren

Name	Beschreibung	Stammsammlung	Literatur
pLVTHM	Lentiviraler Vektor für die Konstruktion von stabilen „knock down“ Zelllinien; EF1 α -Promotor; GFP; H1-Promotor; jeweilige shRNA Sequenz;	H3852	Wiznerowicz und Trono, 2003
psPAX2	Lentiviraler Verpackungs Vektor mit gag und pol Gen;	H3853	Wiznerowicz und Trono, 2003
pMD2G	Verpackungs Vektor mit VSV-G des Vesikular Stomatitis Virus;	H3854	Wiznerowicz und Trono, 2003

HBS Puffer	
HEPES	50 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
NaCl	280 mM
pH	7,13 (mit NaOH)

6.2.10. FACS-Analyse

Für die Messung der Zelloberflächenexposition von Rezeptoren und der Aufnahme von Alexa488 markiertem EGF wurde die FACS-Analyse verwendet. FACS steht für *Fluorescence activated cell sorting*, wobei der Ausdruck FACS eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson ist. Der allgemeine Name des Verfahrens lautet Durchflussszytometrie. Prinzipiell wird bei dieser Methode die Emission optischer Signale gemessen, die von einer Zelle ausgehen, wenn sie einen Laserstrahl passiert. Die in Lösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt, passieren den Laser und emittieren dabei Streulicht. Wenn entsprechende Antikörper oder Fluoreszenzmoleküle gebunden sind, geht zusätzlich ein Fluoreszenzimpuls aus. Aus den Daten lassen sich dann unterschiedliche Eigenschaften von Zellen ableiten. Das Vorwärtstreulicht FSC (*Forward Scatter*) wird durch die Beugung des Lichts hervorgerufen und dient der Ermittlung der Zellgröße. Das Seitwärtstreulicht SSC (*Side Scatter*) entsteht durch die Brechung des Lichts und wird daher zur Messung der Granularität verwendet. Sind z.B. Oberflächenmoleküle einer Zelle durch spezifische Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper markiert, wird die Emission je nach Wellenlänge und Intensität gemessen. Die Zellen können so durch die Auswahl spezifischer Parameter sortiert und/oder analysiert werden. Um durch unspezifisch bindende Antikörper hervorgerufene Emissionen in die Analyse miteinbeziehen zu können, werden die jeweiligen Isotypen als Kontroll-Antikörper eingesetzt. Für die Ermittlung der spezifischen Fluoreszenzintensität einer Färbung, wird der Median der Ereignisse pro Fluoreszenzeinheit der Isotypenkontrolle von dem Median der Ereignisse pro Fluoreszenzeinheit abgezogen, der sich durch die Färbung mit dem spezifischen Antikörper ergibt. Auf diese Art und Weise subtrahiert man die Hintergrundstreuung, die z.B. durch die unspezifische Bindung von Antikörpern auf der Oberfläche von *H. pylori* entsteht.

6.2.10.1. Analyse der Rezeptor-Oberflächenexpression auf eukaryotischen Zellen

Für die Analyse der Exposition bestimmter Rezeptoren auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen wurden nicht-permeabilisierte Zellen mit für die Rezeptoren spezifischen Primär-Antikörpern behandelt. Für die FACS-Analyse wurden zusätzlich Fluorochrom gekoppelte Sekundär-Antikörper eingesetzt.

Die zu behandelnden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit Accutase (Gibco) inkubiert. Accutase ist ein proteolytisches und insbesondere collagenolytisches Enzymgemisch invertibralen Ursprungs, unter dessen Gebrauch ein mildes Ablösen adhärenter Zellen gewährleistet wird. Oberflächenrezeptoren werden so nicht zerstört. Für das Ablösen wurden jeweils 5×10^5 Zellen mit 200 μ l Accutase versetzt und 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 800 μ l PBS aufgenommen und sofort auf Eis überführt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen bei 800 rpm in einer gekühlten Tischzentrifuge 5 min pelletiert und anschließend in 50 μ l 1% BSA/PBS aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde jeweils 0,2 μ g Primär-Antikörper (spezifischer Antikörper oder Isotyp-Kontrolle) zu den Zellen gegeben. Die Färbung erfolgte 15 min auf Eis. Danach wurde die Zellen in 800 μ l PBS aufgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Zellen 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte eine die Färbung der Zellen in 50 μ l 1% BSA/PBS mit 0,2 μ g Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper für 15 min auf Eis. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewaschen und dann in 500 μ l 1% Formaldehyd/PBS aufgenommen, um sie zu fixieren. Alle Ansätze wurden mit dem BD FACSCalibur™ system (BD Biosciences) gemessen. Die Fluoreszenzspektren für Cy2-gekoppelte Färbungen und FITC-konjugierte Antikörper wurden im FL1-H Kanal aufgenommen.

Antikörper für FACS-Färbungen

Name	Spezies	Isotyp	Firma	Bestellnummer	Anwendung
anti EGFR	Maus	IgG2a	Santa Cruz	sc-120	FACS;IP; IF
anti c-Met	Maus	IgG2a	Upstate	05-237	FACS;IP
HLA-FITC	Maus	IgG2a	Immunotech	IM5089	FACS
Isotyp FITC	Maus	IgGa	Immunotech	IM5782	FACS
Cy2	Maus	IgG(H+L)	Dianova	115-225-146	FACS;IF
Isotyp	Maus	IgG2a	Southern Bio-tech	0103-01	FACS

FACS = Durchflusszytometrie; **IP** = Immunopräzipitation; **IF** = Immunofluoreszenz

6.2.10.2. Analyse der Aufnahme von Alexa488-markiertem EGF

Für die Quantifizierung der Liganden-abhängigen Internalisierung des EGF-Rezeptors wurde die Aufnahme von Alexa488-gekoppeltem EGF nach einem Temperatursprung von 37°C per FACS-Analyse bestimmt. Hierfür wurden AGS Zellen zwei Tage vor dem Experiment so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion eine Konfluenz von 90% aufwiesen. Die Zellen wurden in serumfreies Medium überführt und mit dem *H. pylori* Stamm P1 mit einer MOI von 100 infiziert. 20 h nach der Infektion wurden die Zellen auf Eis überführt und 1 h in serumfreiem Medium unter Zugabe von 50 ng/ml EGF-Alexa488 (Sigma) inkubiert. Anschließend wurden die Versuchsansätze mit 37°C warmen serumhaltigem Medium (10% FCS) gewaschen, um ungebundenes EGF zu entfernen. Die Zellen wurden 0, 3, 5, 10 und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Internalisierung durch das erneute Überführen der Zellen auf Eis abgestoppt. Um das nicht aufgenommene EGF auf der Oberfläche der Zellen zu entfernen, wurden die Zellen mit saurem Puffer jeweils zweimal eine Minute auf Eis inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit einem Zellschaber. Für die Fixierung wurden die Zellen bei 800 g abzentrifugiert und das Pellet in 1% Formalin/PBS aufgenommen. Die Analyse der internalisierten Menge an Fluoreszenz-markiertem EGF erfolgte per FACS-Analyse im FLH-1 und FSC Kanal.

Saurer Puffer	
Essigsäure (pH 2,5)	0,2 M
NaCl	0,5 M
H ₂ O <small>bidest</small>	auffüllen

6.2.11. *In vitro* Kinase-Assay

Die Fähigkeit CagA zu phosphorylieren wurde anhand eines *in vitro* Kinase-Assays überprüft. Hierfür wurde der *H. pylori* Stamm P1 von Agarplatten in PBS geerntet ($OD_{550}=0,9$) und in kaltem Kinase Puffer resuspendiert. Durch 20 faches Passagieren der Bakterien durch eine Kanüle (Henke-Sass-Wolf; 0,45 x 25 mm) wurden die Bakterien lysiert. Für die vollständige Lyse wurde das Lysat anschließend zweimal 30 s auf Eis sonifiziert. Für den Assay wurden jeweils 1×10^7 eukaryotische Zellen pro Ansatz in 1 ml eiskaltem Kinase-Puffer aufgenommen und 20 mal durch das Passagieren mit der Kanüle homogenisiert. Für die Kinase-Reaktion wurden 50 µl bakterielles Lysat mit 50 µl Zelllysate vermischt. Das Gemisch wurde mit 40 µM ATP versetzt und 5 min bei 30°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die Ansätze auf Eis überführt. Nach der Zugabe von 4 x SDS-Ladepuffer (Roti®load; Roth) wurden die Proben 5 min bei 95°C abgekocht. Die Phosphorylierung von CagA wurde anschließend per SDS-Page und Immunoblot (siehe S. 122-124) analysiert.

Kinase-Puffer	
Hepes pH 7,0	25 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	10 mM
NP-40	1%
DTT	5 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Complete Protease Inhibitor (Roche)	1x

6.2.12. ELISA

Für die Quantifizierung des humanen Zytokins IL-8 und des murinen IL-8 Homologs Mip-2 in Überständen wurden kommerzielle ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) Detektionskits eingesetzt. Humanes IL-8 wurde mit dem IL-8 Cytoset-Detektionskit von Biosource (International) detektiert. Für die Analyse von sekretiertem Mip-2 muriner Zellen wurde das MIP-2 Quantikine ELISA Kit von R&D Systems (Minneapolis) verwendet. Die Analyse erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Alle Experimente für die Quantifizierung wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte in Triplikaten mit einem Spectra MAX 190 (Molecular Devices).

6.2.13. Immunofluoreszenzfärbung

Für die Analyse der Lokalisation bestimmter Proteine in der Zelle wird die Immunofluoreszenz-Technik verwendet. Hierfür werden Proteine durch die Verwendung spezifischer Antikörper markiert und mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht. Die Emission der an den Sekundär-Antikörper konjugierten Fluorochrome kann man anhand eines Epifluoreszenz-Mikroskops oder mit konfokaler Mikroskopie sichtbar machen und analysieren. Für die exakte Bestimmung der Lokalisation von Proteinen eignet sich die konfokale Mikroskopie, da diese die Aufnahme in definierten Ebenen der Zelle ermöglicht. Möchte man einen allgemeinen Eindruck der Färbungsintensität auf der Oberfläche von Zellen erhalten, wird vorwiegend das Epifluoreszenz-Mikroskop verwendet.

Für die Immunofluoreszenzfärbung von Proteinen werden die zu untersuchenden Zellen auf runden Glasdeckgläschen (12-15 mm Ø) ausgesät. Für eine bessere Anheftung der Zellen wurden die Deckgläschen vor dem Autoklavieren dreimal mit Aceton gewaschen. Die zu färbenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und mit 0,1% TritonX-100/PBS 20 min bei RT permeabilisiert. Für Oberflächenfärbungen wurde dieser Permeabilisierungsschritt ausgelassen. Um die Permeabilisierungslösung zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und schließlich mit 1% BSA/0,05% Tween20/

PBS 10 min bei RT blockiert. Schließlich erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Erstantikörper für 45-60 min. Hierfür wurde der Antikörper in 1% BSA/0,05% Tween20/PBS 1:100 verdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro Deckgläschen auf die Zellen überführt. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal jeweils 10 min mit PBS gewaschen und anschließend 45-60 min mit dem Zweitantikörper inkubiert. Auch dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 in 1% BSA/0,05% Tween20/PBS eingesetzt. Danach wurden die Proben erneut dreimal jeweils 10 min mit PBS gewaschen und am Ende in Moviol auf große Deckgläser überführt. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Leica DM/R durchgeführt. Die konfokalen Mikroskopie-Bilder wurden mit dem Leica TCS NT/SP-1 oder Leica TCS NT/SPE gemacht.

Paraformaldehyd 4%	
Paraformaldehyd (PFA)	4% in H ₂ O _{bidest} lösen bei 60°C
NaOH	1 N (tropfenweise zugeben bis sich PFA löst)
PBS	1x

Moviol	
Glycerol	6 g
Moviol 4-88	2,4 g
H ₂ O bidest	6 ml (2 h bei RT inkubieren)
Tris-HCL	0,2 M; pH 8,5 zugeben; 15 min bei 7500 g zentrifugieren

Antikörper für Immunofluoreszenz

Name	Spezies	Firma	Bestellnummer	Anwendung
anti EGFR	Maus	Santa Cruz	sc-120	FACS; IP; IF
anti EGFR	Kaninchen	Santa Cruz	sc-03	IB; IF
anti c-Met	Kaninchen	Santa Cruz	sc-10	IB; IF
anti EEA1	Maus	Abcam	ab15846	IF
anti H. pylori	Kaninchen	US Biological	H1840-14	IF
Cy2 anti ms	Maus	Dianova	115-225-146	FACS; IF
Cy3 anti rb	Kaninchen	Dianova	111-165-144	IF
Cy3 anti ms	Maus	Dianova	715-165-151	IF

FACS = Durchflusszytometrie; IB = Immunoblot; IF = Immunofluoreszenz; Immunopräzipitation

6.2.14. Wundheilungs-Experimente

Um die Fähigkeit von Zellen zu überprüfen, konfluente Zellmonolayer wieder zu schließen, nachdem die Schicht durch das Setzen eines Kratzers durchbrochen wurde, werden Wundheilungs-Experimente durchgeführt (**Abb. 4.17**). Die Geschwindigkeit mit der Zellen die durch den Kratzer entstandene Lücke im Zellmonolayer wieder schließen, wird als Maßstab

für die Wundheilungsqualität verwendet. Für die Analyse wurde mit Hilfe einer weißen Pi-pettenspitze ein ca. 1 cm langer Kratzer durch einen konfluenten Zellmonolayer gezogen. Anfang und Ende des Kratzers wurden mit einem Stift auf der Plastischalenunterseite markiert, um die Position des Kratzers lokalisieren zu können. Das Zuwachsen der entstandenen Lücke wurde durch Aufnahmen mit einem Lichtmikroskop (Zeiss) dokumentiert. Die Dicke des Kratzers wurde durch Abmessen der Abstände mit dem Programm Photoshop CS3 ermittelt.

6.3. Material und Methoden zum Umgang mit *H. pylori*

6.3.1. *Helicobacter* Stämme

Stamm	Stamm-sammlung	Mutierter Genlokus	Offener Leserahmen*	Antibiotika-Resistenz	Literatur
P1	P1 (HP1101)	WT	-	-	Corthesy-Theulaz <i>et al.</i> , 1996
P12	P12 (HP8880)	WT	-	-	Schmitt und Haas, 1994
P1 Δ virB11	P208	virB11	HP0425	Cam ^R	Selbach <i>et al.</i> , 2002b
P1 Δ cagA	P211	cagA	HP0547	Cam ^R	Selbach <i>et al.</i> , 2002b
P12 Δ PAI	P387	cagPAI	cagPAI	Kan ^R	Wessler <i>et al.</i> , 2000
G27	P409	WT	-	-	Salama <i>et al.</i> , 2004
G27 Δ cagE	P408	cagE	cagE	Kan ^R	Salama <i>et al.</i> , 2004
Mutanten Bibliothek	H3871	-	-	Cam ^R	Salama <i>et al.</i> , 2004

*ORF nach (Tomb *et al.*, 1997); WT: Wildtyp

6.3.2. Kultivierung

Vor jedem experimentellen Ansatz wurden die Bakterien aus einem Glycerolstock (BHI/20% Glycerol) auf eine dem bakteriellen Stamm entsprechende Platte überführt. Hierfür wurden die Bakterien in flüssigem BHI-Medium resuspendiert und ausgestrichen. Nach drei Tagen Inkubationszeit unter mikroaerophilen (5% CO₂, 4% O₂) Bedingungen bei 37°C wurden die Bakterien in verschiedenen Verdünnungen auf neue Agarplatten überführt. *H. pylori* neigt unter zu dichten Wachstumsbedingungen zu einer morphologischen Veränderung, in der eine coccoide Form eingenommen wird und wichtige Virulenz-Gene nicht mehr exprimiert werden. Deshalb wurden die Bakterien für Infektionsansätze stets nach einer eintägigen Inkubation auf frischen Platten eingesetzt. Um Mutations-Effekte zu vermeiden, wurden die Bakterien nach einer einwöchigen Kultivierung auf Agarplatten entsorgt.

Agarplatten	
GC Agar Base (Remel)	36 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1 L
Autoklavieren, dann folgende Komponenten zusetzen:	
Pferdeserum (inaktiviert; Biochrom)	100 ml
Vitamin-Mix	10 ml
Nystatin (2 mg/ml)	500 µl
Trimetoprim (2,5 mg/ml)	2 ml
Vancomycin (10 mg/ml)	1 ml
je nach Stamm folgende Antibiotika zusetzen:	
Chloramphenicol (4 mg/ml)	1 ml
Kanamycin (8 mg/ml)	1 ml

Vitamin-Mix	
Lösung 1	
D(+)-Glukose (wasserfrei)	100 g
L-Glutamin	10 g
L-Cysteine Hydrochlorid Monohydrat	26 g
Coccarboxylase	100 mg
Coccarboxylase	20 mg
Eisen (III)-Nitrat Nanohydrat	3 mg
Vitamin B1 Hydrochlorid	13 mg
p-Aminobenzosäure	250 mg
NAD	10 mg
Vitamin B12	ad 500 ml
H ₂ O _{bidest}	
Lösung 2 (Licht-geschützt lagern)	
L-Cystein	1,1 g
L-Cystein	1 g
Adenine	30 mg
Guanin-Cl	150 mg
L-Arginin Monohydrochlorid	500 mg
Uracil	ad 300 ml
H ₂ O _{bidest}	
32% HCL	15 ml
beide Lösungen mischen	
H ₂ O _{bidest}	ad 1 L

Antibiotika	
Nystatin	2 mg/ml in N,N-Dimethylformamid
Trimetroprim	2,5 mg/ml in N,N-Dimethylformamid
Vancomycin	10 mg/ml in H ₂ O _{bidest}
Cloramphenicol	4 mg/ml in 100% Ethanol
Kanamycin	8 mg/ml in H ₂ O _{bidest}

Medien	
BHI (<i>brain heart infusion</i>) Flüssigmedium (Becton Dickinson)	36 g in 1000 ml H ₂ O _{bidest}
Einfriermedium	BHI-Medium mit 20% Glycerol

6.3.3. Infektion eukaryotischer Zellen

Die Bakterien wurden in 1 x PBS resuspendiert und einmal mit PBS gewaschen. Hierfür wurden die Bakterien drei min bei 4000 rpm in einer Zentrifuge pelletiert und wieder erneut in PBS aufgenommen. Für die Bestimmung der jeweiligen MOI (MOI; *multiplicity of infection*; Anzahl der Bakterien pro Zelle) wurde die optische Dichte der bakteriellen Lösung bei einer Wellenlänge von 550 gemessen. Die Konzentration der Bakterien pro ml wurde anhand einer Eichgerade (Abb. 6.1) abgelesen. Die daraus resultierende Menge der einzusetzenden Bakterien wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Menge der einzusetzenden Bakterien} = \frac{(\text{Zellmenge/ml}) \times \text{MOI}}{(\text{Bakterien/ml})}$$

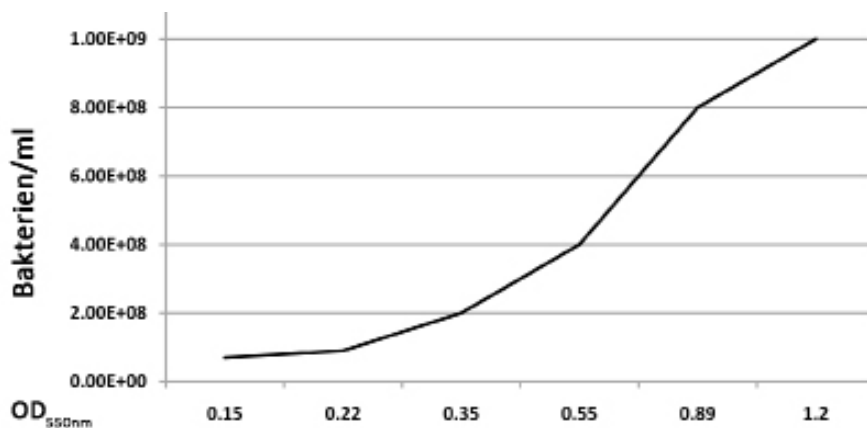


Abb. 6.1: Eichgerade zur Ermittlung der Bakterienmenge pro ml.

Die Bakterien werden in PBS resuspendiert. Die optische Dichte wird in einem Photometer bei 550 nm gemessen und die Bakterienmenge pro ml wird anhand dieser Eichgerade abgelesen.

6.4. Allgemeine Proteintechniken

6.4.1. Immunodetektion von Proteinen

Für die Detektion von Proteinen mittels Immunoblot wurden alle Probenpellets in 1 x SDS-Probenpuffer (Roti®load; Roth) aufgenommen und 5 min bei 95°C abgekocht. Anschließend wurden die Proteine in den Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt

6.4.1.1. SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einer diskontinuierlichen Natrium Dodezyl-Sulfat (*sodium dodecyl sulfat*; SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierfür wurde das Mini-PROTEAN® III Gelsystem von Bio-Rad verwendet. Zuerst wurden 10%ige Trenngele gegossen. Diese wurden zum auspolymerisieren mit Wasser überschichtet und 15 min bei RT inkubiert. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgenommen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet.

Die Gele wurden in die Gelkammern überführt und mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Vor dem

Auftragen der Proben in die Geltaschen (25 µl pro Probe) wurden sie nochmals 5 min bei 95°C gekocht. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde zusätzlich ein gefärbter, genormter Proteinmarker (Invitrogen) in eine Geltasche überführt. Anschließend liefen die Proben und der Marker bei 80 V ein. Nach dem Durchqueren des Sammelgels wurde die Spannung auf 180 V erhöht.

10% Trenngel	
H ₂ O _{bidest}	4 ml
30% Bisacrylamid	3,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% Ammonium Persulfat	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Sammelgel	
H ₂ O _{bidest}	2,7 ml
30% Bisacrylamid	0,67 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
10% SDS	0,04 ml
10% Ammonium Persulfat	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

6.4.1.2. Immunoblot

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im Gel auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen transferiert. Hierfür wurde das Mini Trans-Blot Cell System von Bio-Rad verwendet. Die Membran wurde im Westernblotpuffer aktiviert und für den Transfer zusammen mit dem Gel nach Beschreibung des Herstellers aufgebaut. Das Gel-system wurde mit Westernblotpuffer aufgefüllt und der Transfer erfolgte 2 h mit 250 mA bei 4°C.

Die Proteine auf der Membran wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Hierfür wurde die Membran 30-45 min in Blockierungs-Puffer (TTBS/3% BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurden die Antikörper in TTBS verdünnt und mind. 1 h mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit TTBS gewaschen. Der Hrp (*Horseradish-Peroxidase*)-gekoppelte Zweitantikörper wurde ebenfalls in TTBS verdünnt und 45-60 min mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit PBS gewaschen. Die Proteine wurden durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dafür wurde das Renaissance Western Blot System (ICN) verwendet.

Um Membranen erneut mit anderen Antikörpern zu inkubieren, wurden die Antikörper aus dem vorherigen Durchgang entfernt. Hierfür wurde die Membran 30 min in „Stripping“ Puffer bei 50°C inkubiert und anschließend dreimal mit TTBS gewaschen. Nach einem Blockierungsschritt wurden die Membranen wie oben beschrieben mit neuen Antikörpern inkubiert.

Antikörper für Immunoblots

Name	Spezies	Firma	Bestellnummer	Anwendung
anti ERK1/2 Thr202/Tyr204	Maus	Cell Signaling	9106	IB
anti EGFR	Kaninchen	Santa Cruz	sc-03	IB; IF; IP
anti c-Abl	Maus	B&D	554148	IB
anti EGFR Tyr1173	Kaninchen	Cell Signaling	4407	IB
anti EGFR Tyr992	Kaninchen	Cell Signaling	9922 (Kit)	IB
anti EGFR Tyr1045	Kaninchen	Cell Signaling	9922 (Kit)	IB
anti EGFR Tyr845	Kaninchen	Cell Signaling	9922 (Kit)	IB
anti EGFR	Kaninchen	Cell Signaling	9922 (Kit)	IB
anti pY99	Maus	Santa Cruz	sc-7020	IB
anti c-Met	Kaninchen	Santa Cruz	sc-10	IB
anti SHC	Kaninchen	Transduction	610081	IB; IP
anti SHC	Maus	Santa Cruz	sc-967	IB
anti Grb2	Maus	Transduction	610112	IB
anti Grb2	Kaninchen	Santa Cruz	sc-255	IB; IP
anti Aktin	Maus	Sigma	A5441	IB
anti SHC Tyr239/240	Kaninchen	Santa Cruz	sc18074-R	IB
anti SHP-2	Kaninchen	Santa Cruz	sc-280	IB
anti PLC γ 1	Kaninchen	Santa Cruz	sc-426	IB
anti PLC γ 1 Tyr783	Kaninchen	Cell Signaling	2821	IB
anti phospho-Akt Substrat	Kaninchen	Cell Signaling	9614	IB
anti Akt Ser473	Kaninchen	Cell Signaling	2965	IB
anti Akt Thr308	Maus	Cell Signaling	4060	IB
anti MEK1/2 Ser217/221	Kaninchen	Cell Signaling	9121	IB

IP = Immunopräzipitation; IB = Immunoblot; IF = Immunofluoreszenz

6.5. Immunopräzipitation

Anhand der Immunopräzipitation von Proteinen können nach einer anschließenden Immunoblot-Analyse sowohl Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden als auch bestimmte Proteinmodifikationen wie die Phosphorylierung oder Ubiquitinylierung spezifischer Proteine analysiert werden.

Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen in der Zellkulturschale auf Eis überführt und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml PBS/100 mM OVan (Ortho-Vanadat) überführt und mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden bei 2500 rpm in einer gekühlten Tischzentrifuge (4°C) 5 min zentrifugiert und das Pellet wurde für die Lyse in 500 μ l Ripa-Puffer aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch 10-14 maliges passagieren durch eine Spritze (Kanüle: Henke-Sass-Wolf; 0,45 x 25 mm) weiter lysiert. Zwischen jedem zweiten Passagierschritt wurde das Lysat 1 min auf Eis inkubiert und die nächste Probe bearbeitet. Anschließend wurden die

Proben 10 min bei 13 000 rpm in einer gekühlten Tischzentrifuge (4°C) zentrifugiert um den Zell-Debris zu entfernen. Das Lysat wurde 30 min bei 4°C auf einem Rotationsrad mit 20 µl Protein A/G Sapharose-*Beads* (Pierce) inkubiert, um unspezifische Bindungen. Das Lysat und die *Beads* wurden bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt. Pro Ansatz wurden 2 µg des jeweiligen Antikörpers zugegeben. Die Proben wurden ü.N. bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µl *Beads* zu den Proben gegeben, diese wurden dann nochmals 2 h auf dem Rotationsrad bei 4°C inkubiert, um die Bindung der *Beads* an die an den Antikörpern gebundenen Proteine zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurden die Proben 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Die *Beads* wurden dreimal mit Ripa-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 30 µl 1 x Ladepuffer (Roti®load; Roth) aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht. Weiterführende Analysen wurden mittels Immunoblot durchgeführt (**Abschnitt 6.4**; S. 122-124).

Ripa-Puffer	
TritonX-100	1%
Tris-HCl	50 mM
NaCl	300 mM
EDTA	5 mM
Natrium-Azid	0,02% (w/v)
pH	7,4
Vor der Benutzung werden folgende Komponenten frisch dazugegeben:	
OVan (Ortho-Vanadat)	100 mM
Protease-Inhibitor Cocktail (Roche)	1 x

Antikörper für Immunopräzipitation und Immunoblotanalyse der Präzipitate

Name	Spezies	Firma	Bestellnummer	Anwendung
anti EGFR	Kaninchen	Santa Cruz	sc-03	IP
anti pY99	Maus	Santa Cruz	sc-7020	IB
anti SHC	Kaninchen	Transduction	610081	IP
anti SHC	Maus	Santa Cruz	sc-967	IB
anti Grb2	Maus	Transduction	610112	IB
anti Grb2	Kaninchen	Santa Cruz	sc-255	IP
anti Aktin	Maus	Sigma	A5441	IB
anti c-Met	Maus	Upstate	05-237	IP

IP = Immunopräzipitation; IB = Immunoblot

Allgemeine Puffer für proteinbiochemische Arbeiten

1 x Westernblotpuffer	
10 x	
Tris-Base	60 g
Glyzin	288 g
H ₂ O _{bidest}	ad 2 L
1 x	
10 x Westernblotpuffer	200 ml
Methanol	400 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 2 L
10 x TBS	
NaCl	80 g (140 mM)
KCl	2 g (2,7 mM)
Tris-Base	30 g (25 mM)
H ₂ O _{bidest}	ad 1 L
1 x TBST	
Tween 20	1 ml
1 x TBS	ad 1 L
„Stripping“ Puffer	
Tris-HCl	62,5 mM pH 6,7
β-Mercaptoethanol	100 mM
SDS	2%
10 x SDS Puffer	
Tris-Base	30,2 g
Glyzin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1 L
pH	>8,3

6.6. RNA-Techniken

6.6.1. Real-Time PCR

Die Analyse der mRNA-Expression von IL-8, Egr1 und Fos erfolgte mittels *Real-Time* PCR (quantitative Reverse Transkriptase (RT) Polymerasen-Kettenreaktion). Diese Methode ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse der mRNA-Expression. Hierbei wird RNA als Transkriptionsvorlage für eine PCR verwendet, die durch den Einsatz einer Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben wird. Hierbei wird der DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Dieser ermöglicht die quantitative Erfassung der synthetisierten DNA Molekü-

le durch die Messung laserinduzierter Fluoreszenzsignale. Für die *Real-Time* PCR wurde RNA aus 1×10^6 Zellen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Reinheit der RNA wird photometrisch bestimmt, indem die Extinktion bei $\lambda=260$ nm (DNA) und $\lambda=280$ nm gemessen wurde. Ist der Koeffizient kleiner als 2, ist die RNA mit Proteinen, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) verunreinigt. In diesem Fall muss die RNA erneut aufgereinigt werden. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 ng/ μ l.

Die RNA wurde mit Hilfe des QuantiFast SYBR Green PCR Kits (Qiagen) wie folgt für die Real-Time PCR vorbereitet:

Primer Mix	
FW Primer (100 mM)	20 μ l (10 μ M Endkonzentration)
Rev Primer (100 mM)	20 μ l (10 μ M Endkonzentration)
H ₂ O _{bidest}	160 μ l

PCR Mix (pro Reaktion)	
Sybr Mix (Qiagen-Kit)	10 μ l
Primer Mix	0,5 μ l
H ₂ O _{bidest}	4,25 μ l
RT-Mix (Qiagen)	0,25 μ l

Von dem Reaktionsgemisch wurden 15 μ l zusammen mit 10 μ l (10 ng/ μ l) RNA vermengt und für die Real-Time PCR eingesetzt. Die Reaktion wurde mit dem unten angegebenen PCR-Profil mit einem 7900 HT Fast Real-Time PCR-System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm SDS 2.2.2 (Applied Biosystems) und Excel (Microsoft).

PCR Profil	
30 min	50°C
15 min	95°C
40 Zyklen:	
20 s	94°C
40 s	60°C
40 s	72°C
Schmelzkurve:	
15 s	95°C
15 s	60°C
15 s	95°C

6.7. Material und Methoden zum bakteriellen *Screen*

6.7.1. Das *Read-out* System

Für den *Screen* wurde eine klonale Reporterzelllinie eingesetzt (AGS SIB02), die die NF- κ B Untereinheit p65 (RelA) als GFP-Fusionsprotein exprimiert (Bartfeld et al; in Vorbereitung). Da es sich bei der Reporterzelllinie um eine humane gastrische Epithelzelllinie handelt, ist die *H. pylori* induzierte NF- κ B Aktivierung hier T4SS abhängig. p65 wird in nicht aktivierten Zellen durch den NF- κ B Inhibitor I κ B α im Zytoplasma gehalten. Kommt es durch externe Stimuli wie bakterielle Effektoren, IL1- β oder TNF- α zu einer Aktivierung des I κ B Kinase (IKK)-Komplexes, phosphoryliert dieser I κ B α und induziert so die proteosomale Degradierung des p65-Inhibitors I κ B α . Daraufhin wird p65 freigesetzt und als Homo-oder Heterodimer in den Nukleus transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor an DNA bindet und die Genexpression zahlreicher Gene wie IL-8, IL-2, CD74 und Cox2 induziert. Durch den Einsatz eines automatischen Fluoreszenz-Mikroskops (Scan^R; Olympus), können aktive und inaktive Zellen im 96-Well-Maßstab erfasst werden (**Abb. 6.2**). In den daraus resultierenden Aufnahmen unterscheiden sich aktive Zellen von inaktiven Zellen durch die nukleare Lokalisation des p65-GFP-Fusionsproteins.

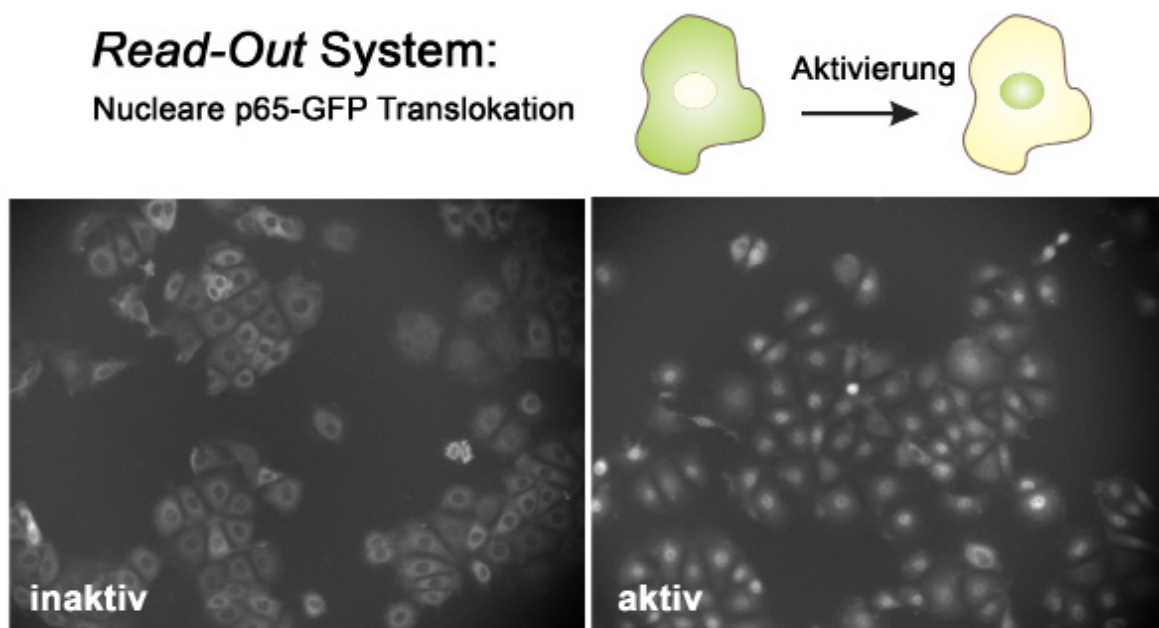


Abb. 6.2: Nukleare Translokation des p65 GFP-Fusionsproteins in *H. pylori* infizierten AGS Zellen.

Die Reporterzelllinie AGS SIB02 wurde in einer 96 Well-Platte ausgesät und 45 min mit dem *H. pylori* Wildtyp-Stamm P1 (MOI 100) infiziert. Die infizierten (aktiv) und nicht infizierten (inaktiv) Zellen wurden mit MetOH fixiert und mit einem automatischen Fluoreszenz-Mikroskop (Scan^R Olympus; 10 fache Vergrößerung) analysiert. Aktivierte Zellen unterscheiden sich von inaktiven Zellen durch die nukleare Lokalisation des p65-GFP-Fusionsproteins (oben).

Durch eine Computeranalyse der aufgenommenen Bilder (Scan^R Programm; Olympus) kann die Anzahl der aktivierten und nichtaktivierten Zellen in einem Versuchsansatz quantitativ ermittelt werden. Hierfür müssen die Zellkerne durch eine vorhergehende Färbung des Zell-

kerns mit bis-Benzamidine (1:10 000) angefärbt werden, damit das Programm jede aufgenommene Zelle als ein einzelnes Objekt erkennt und analysieren kann. Durch die Einteilung der erfassten Zellen in definierte Zellpopulationen liefert die Computeranalyse die Anzahl aller aktiven und inaktiven Zellen in einem Ansatz und ermöglicht so eine quantitative Ermittlung der NF- κ B Aktivierung (Abb. 6.3).

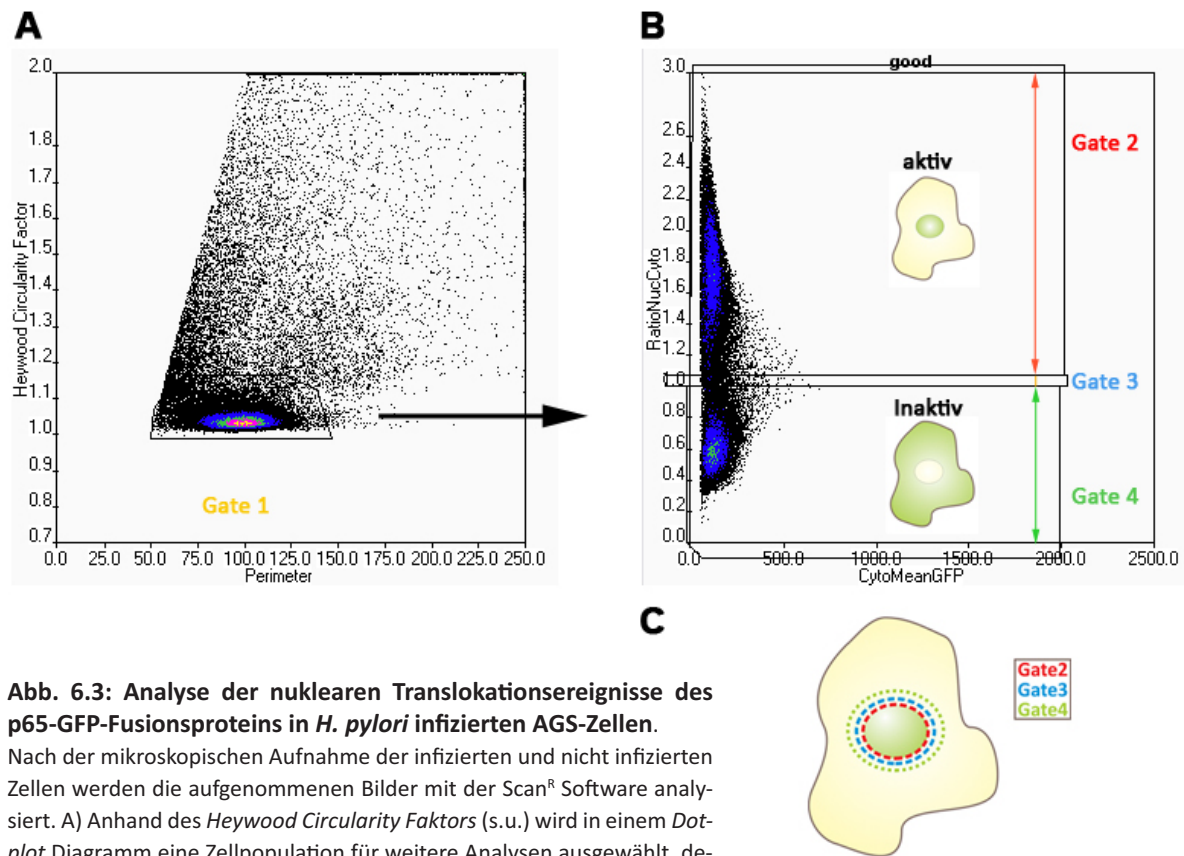


Abb. 6.3: Analyse der nuklearen Translokationsereignisse des p65-GFP-Fusionsproteins in *H. pylori* infizierten AGS-Zellen.

Nach der mikroskopischen Aufnahme der infizierten und nicht infizierten Zellen werden die aufgenommenen Bilder mit der Scan^R Software analysiert. A) Anhand des *Heywood Circularity Faktors* (s.u.) wird in einem *Dot-plot* Diagramm eine Zellpopulation für weitere Analysen ausgewählt, deren Nukleus eine normale Größe und Granularität aufweist (Gate 1). B) Ein weiterer Analyse-Schritt besteht darin, die Zellen aus der ersten Zellpopulation in drei weitere Zellpopulationen zu unterteilen, die sich in ihrem Verhältnis von nuklearem zu zytoplasmatischem GFP (RatioNucCyto) in Abhängigkeit zum zytoplasmatischen GFP-Median (CytoMeanGFP) unterscheiden. Ist das Verhältnis größer als eins, werden die Zellen als aktiv klassifiziert (Gate 2), liegt das Verhältnis unter eins werden die Zellen als inaktiv eingestuft (Gate 4). Zusätzlich wurde eine Intermediäre Zone definiert, die nicht in die Auswertung mit einfließt (Gate 3). C) Durch diese Unterteilung können drei unterschiedliche Regionen der Zelle definiert werden, in denen der jeweilige GFP-Gehalt analysiert und ausgewertet wird. Gate 2 definiert die nukleare Zone, Gate 3 definiert die intermediäre Zone und Gate 4 definiert den zytoplasmatischen Bereich der Zelle.

Der in Abb. 6.3 beschriebene *Heywood Circularity Faktor* (HCF) wird für die Definition von Partikelformen verwendet. Er wird durch folgende Formel definiert:

$$\text{HCF} = \text{Partikeldurchmesser} / (2 \times \sqrt{(\pi \times \text{Partikelfläche})})$$

Unter Verwendung der Zelllinie AGS SIB02, der in Abb. 6.2 und 6.3 beschriebenen Analyse-Methode und einer Transposon-mutagenisierten *H. pylori*-Bibliothek (Salama *et al.*, 2004) wurde hier eine *Screening*-Methode entwickelt, mit der eine große Anzahl einzelner bakterieller Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet werden kann, NF- κ B zu aktivieren. Da die NF- κ B

Antwort von potentiellen Effektoren, einem funktionalen T4SS und der erfolgreichen Adhäsion der Bakterien an die Wirtszellen abhängt, ermöglicht diese *Screening*-Methode die Identifikation von T4SS assoziierten Proteinen, neuen NF- κ B-Effektoren und unbekannten Adhäsinen.

Reporter Zelllinie

Name	Quelle	Zelltyp	Modifikation	Medium	Literatur
AGS SIB02	Ursprung (AGS): ATCC: CRL 1739	Klonale humane gastrische Adenokarzinom-Epithelzelllinie	Stabil inseriertes p65-GFP Fusionsprotein	RPMI 1640 (Gibco BRL), 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	Bartfeld <i>et al.</i> ; in Vorbereitung

6.7.2. Die bakterielle Transposon-basierte Mutanten-Bibliothek von *H. pylori*

Die verwendete *H. pylori* Bibliothek umfasst 5363 verschiedene Transposon-Mutanten. *MicroArray* Analysen haben gezeigt, dass nur 344 der ca. 1500 Gene von *H. pylori* bei der Herstellung der Bibliothek nicht mutagenisiert werden konnten (Salama *et al.*, 2004). Hierbei stellte sich heraus, dass der größte Anteil dieser Gene essentiell sind und demzufolge ihre Deletion letal ist. Da deshalb mit einer neuen Mutagenese keine höhere Mutanten-Ausbeute zu erwarten war, wurde diese Mutanten-Bibliothek sowohl für die Etablierung als auch für den *Screen* selbst verwendet.

6.7.3. Identifikation der Transposon-Insertionsorte

Für die Identifizierung des Transposon-Lokus innerhalb des bakteriellen Genoms wurde der Insertionsort mit der Hilfe des Transposon-Primers S2 sequenziert (siehe Abb. 6.4). Hierfür wurde die genomische DNA der in Frage kommenden Mutanten isoliert und zum Sequenzieren geschickt. Die so erhaltene Sequenz wurde auf der Internetseite von NCBI mit dem BLAST-Programm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit der genomischen Sequenz aller sequenzierten *H. pylori* Stämme (26695; J99; G27) verglichen.



Abb. 6.4: Lage des Transposon-Primers S2.

Transposon (Tn7) des *in vitro* Mutagenese-Vektors pGPS-cat mit Chloramphenicol Acyltransferase kodierender Sequenz (CAT) als Selektionsmarker. Der Primer S2 bindet an der linken Transposonseite. Die Sequenzierung mit diesem Primer führt zu einer Identifikation des linken flankierenden Sequenzbereichs des genomischen Transposon-Lokus.

Name	Sequenz	Literatur
S2	5'CAGTTCCCAACTATTTGTCC 3'	Salama <i>et al.</i> , 2004

6.7.4. Vereinzelung und Vorbereitung der Mutanten für den Screen

Eine der wichtigsten Aufgaben der Etablierungs-Prozedur bestand darin, eine *Screening*-Methode zu entwickeln, die es zulässt, die Klone auf einfachem Weg zu vereinzeln um ihre Fähigkeit NF- κ B zu aktivieren in einem großen Maßstab zu testen. Dies wurde wie folgt bewerkstelligt. Die Kontroll-Stämme und die Bibliothek wurden aufgetaut und ausplattiert. Als Negativkontrollen wurden der Wildtyp-Stamm G27 und die Bibliotheks-Mutante Klon 1 verwendet, da sie NF- κ B aktivieren. Als Positivkontrolle wurde Klon 2B verwendet, der kein NF- κ B aktiviert. Klon 1 und Klon 2B erschienen als besonders geeignet, da sie aus der Mutanten-Bibliothek stammen, die auch für den *Screen* verwendet wird.

Nach einer dreitägigen Inkubation wurden die Bakterien mit Verdünnungsausstrichen vereinzelt. Nach einer weiteren zweitägigen Inkubationsphase wurden acht Einzelklone pro Kontrolle und 72 Einzelklone der Mutanten-Bibliothek in 1 cm lange Streifen auf eine neue Agarplatte (10 cm Durchmesser) transferiert (**Abb. 6.5A**). So konnten 96 Einzelklone auf einer Mikrotiterplatte inkubiert werden. Dieses Verfahren ermöglichte ein vereinheitlichtes Wachstum der Bakterien und demzufolge den Erhalt einer einheitlichen Koloniegröße pro Klon.

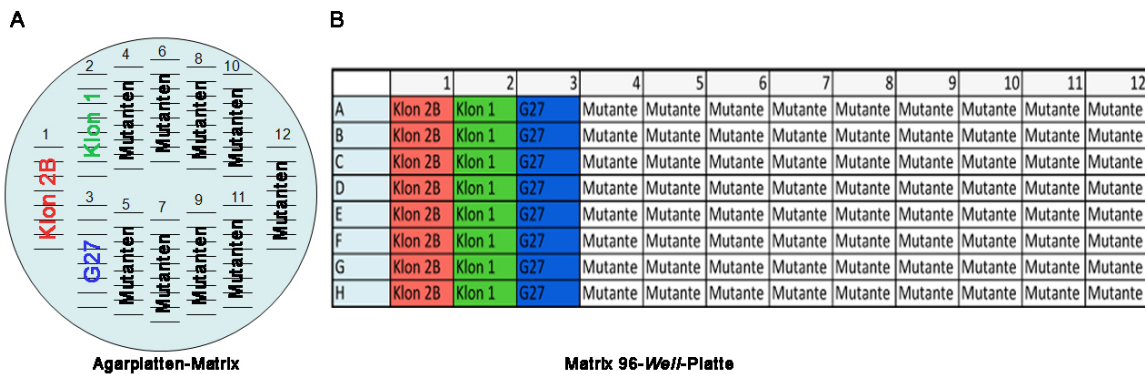


Abb. 6.5: Platten-Matrix.

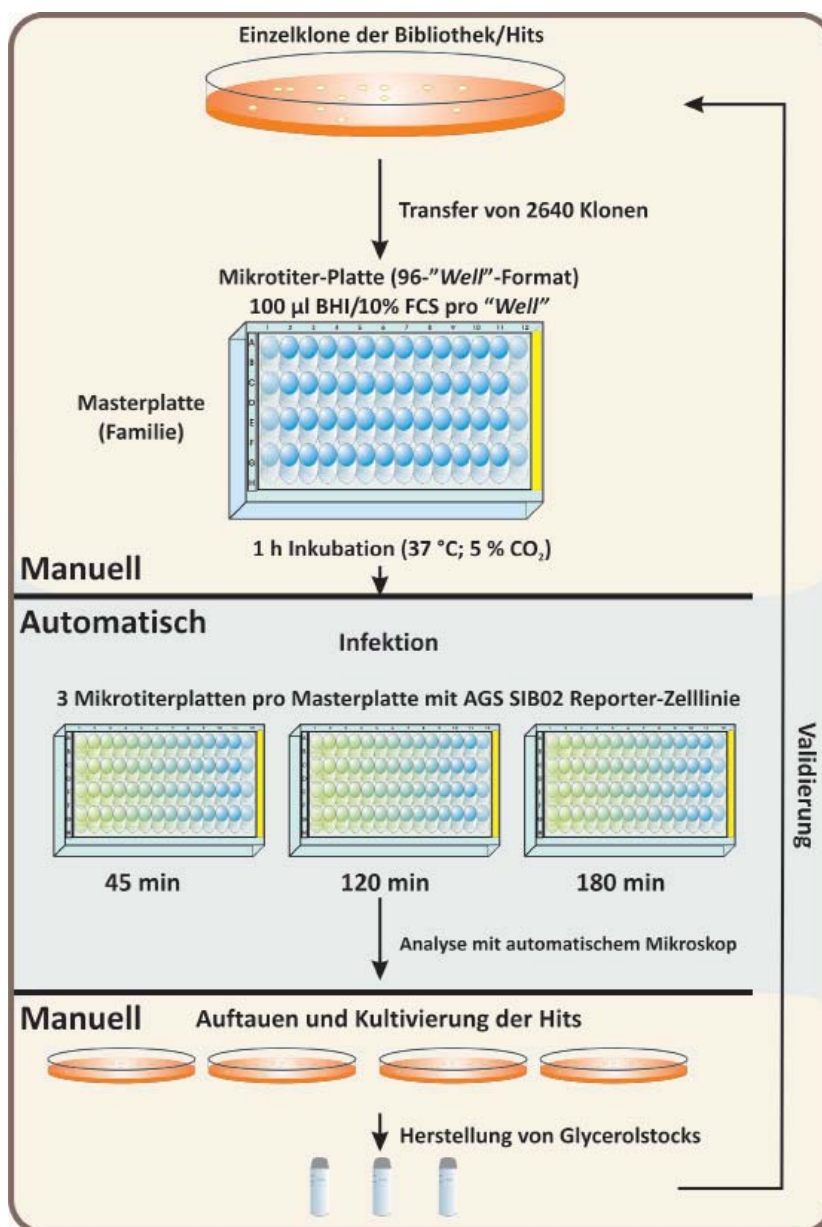
A) Die Mutanten-Bibliothek und die Kontrollen wurden im Verdünnungsausstrich ausplattiert. Acht Einzelklone pro Kontrolle (Klon 2B, Klon 1 und G27) und 72 Einzelklone der Bibliothek wurden in Form eines jeweils 1 cm breiten Streifens auf eine neue Platte überführt. Die Platte wurde zwei Tage bei 37°C inkubiert und anschließend für den *Screen* eingesetzt. B) die 96 Einzelklone der Agar-Platte wurden anschließend in eine mit BHI+10%FCS gefüllte 96-Well-Platte überführt. Hierbei wurde die Matrix der Agar-Platte von oben nach unten in den Reihen 1-12 übernommen.

Nach zweitägiger Inkubation wurden die Bakterien-Agarplatten für den semi-automatischen *Screen* eingesetzt. Die Einzelklone auf den Agarplatten wurden manuell jeweils in ein Well einer 96-Well-Platte überführt, die mit 100 µl BHI+10%FCS pro *Well* gefüllt war (**Abb. 6.5B**). Da die Agar-Platte insgesamt 96 Einzelklone umfasste, konnten die Klone der Agarplatten-Matrix von oben nach unten den Reihen 1-12 folgend in die 96-Well-Platte transferiert werden. Jede dieser 96-Well-Platten repräsentierte hierbei eine bakterielle Masterplatte, auch Familie genannt. Für die Inkubation der Bakterien wurde ein doppelbegasbarer Inkubator (Thermo Electronic Cooperation; Thermoforma Series2) verwendet, der sowohl den O₂ als auch den CO₂ Gehalt misst und einstellt (O₂: 4%; CO₂: 5%), um mikroaerophile Bakterien wie *H. pylori* inkubieren zu können.

6.7.5. Etablierung der automatisierten *Screening*-Plattform

Nach der manuellen Etablierung des Systems sollte die Prozedur nun auf eine automatische Roboter-Plattform überführt werden. Die folgende *Screening*-Strategie lieferte schließlich sowohl konstante Aktivierungsmuster der eingesetzten Kontrollen als auch die einfachste Handhabung bei der Bearbeitung einer großen Anzahl an Einzelklonen.

Nach der Vereinzelung wurden die Klone der Bibliothek in jeweils ein Well einer 96-Well Multiterplatten (Masterplatten) transferiert (**Abb. 6.5**). Die Masterplatten wurden vor dem Transfer mit 100 µl Medium (BHI/10%FCS) pro *Well* befüllt. Nach der Überführung der Klone wurden diese 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die automatische Infektion mit der Biomek FP Workstation. Hierfür wurden jeweils 25 µl pro Ansatz von der Masterplatte, auf jeweils eine von drei Reporter-Platten mit der Reporterzelllinie AGS SIB02 überführt (**Abb. 6.6**). Jede der drei Platten wurde für jeweils einen Infektionszeitpunkt (45, 120 und 180 min) eingesetzt. Die restlichen 25 µl Bakteriensuspension der anfänglichen 100 µl wurde in der Masterplatte bei -80°C weggefroren und gelagert.

**Abb.6.6: Screening Ablauf.**

Einzelklone der Kontroll-Stämme und Mutanten werden manuell von Agar-Platten in 96-Well Mikrotiterplatten überführt (S. 132). Diese beinhalten 100 µl BHI+10% FCS pro Well. Die Mikrotiterplatten werden als Masterplatten oder Familien bezeichnet und 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend werden die Platten in den Inkubator des Roboters (S. 133) überführt, der pro Familie jeweils drei weitere Mikrotiterplatten mit der AGS SIB02 Zelllinie (Reporter-Platten) enthält. Jede dieser Platten wird für jeweils einen der drei zu messenden Infektionszeitpunkte (45, 120 und 180 min) verwendet. Der Roboter überführt jeweils 25 µl Bakteriensuspension der Masterplatte pro Infektionszeitpunkt in die korrespondierenden Reporter-Platten. Die restlichen 25 µl werden in der Masterplatte bei -80°C weggefroren. Die Infektionsplatten werden nach den jeweiligen Infektionszeitpunkten fixiert und mit dem automatischen Mikroskop und der Analyse-Software ausgewertet. Nach der Identifikation der Hits werden die Masterplatten wieder aufgetaut, die jeweiligen Hits ausplattiert, rekultiviert und Glycerolstocks für die langfristige Lagerung angefertigt. Jeder Hit wird in mind. zwei unabhängigen Validierungsrunden überprüft.

Die Reporter-Platten wurden nach Ablauf der jeweiligen Infektionszeitpunkte fixiert. Die fixierten Platten wurden dann mit dem automatischen Scan^R Mikroskop und der Scan^R Analyse-Software ausgewertet (S. 128-129). Nach der Identifizierung potentieller Hits wurden die Masterplatten wieder aufgetaut, die jeweiligen Hits auf Agarplatten überführt und drei Tage rekultiviert. Anschließend wurden Glycerolstocks angefertigt, um eine längere Lagerung zu ermöglichen. Alle Hits der ersten Runde werden durch mind. zwei unabhängige Validierungsrunden nochmals analysiert und überprüft, um falsch-positive Mutanten auszuschließen.

6.7.6. Der Roboter und die Roboter-Software

Bei dem für den bakteriellen Screen eingesetzten Roboter handelt es sich um eine Biomek FXP Workstation (Beckman & Coulter). Das Roboter-Programm wurde mit der Sami_{ex}-Software geschrieben.

6.7.7. Der Z-Score für die Definition von *Hits*

Der Z-Score gibt die Abweichung eines Messwerts vom Mittelwert der Gesamtmessung in Vielfaches der Standardabweichung an. Er liefert so eine präzise Aussage über den Aktivierungs-Charakter einer Mutante. Bei der Kalkulation des Z-Scores werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen aller Kontrollen nicht miteinbezogen.

$$\text{Z-Score} = (\text{Messwert} - \mu \text{ Messwert}) / (\delta \text{ Messwerte})$$

μ = Mittelwert

δ = Standardabweichung

Eine Mutante wurde dann als *Hit* eingestuft, wenn sowohl ihr Z-Score als auch ihr Aktivierungsmuster entweder denen der Positivkontrolle von Klon 2B nach 45 min Infektion entsprachen (mind. -1), oder zu späteren Infektionszeitpunkten weit höher lagen als die der Negativkontrollen Klon 1 oder G27 (mind. 0,8). Hierbei handelte es sich folglich entweder um potentielle *Hits*, die Mutationen in Genen von NF- κ B aktivierenden Proteinen tragen oder um Mutanten, die Mutationen in Genen für NF- κ B inhibierende Proteine tragen.

6.7.8. Der Z' Faktor zur Ermittlung der Qualität eines Screens

Der Z' Faktor (Z-Prime-Faktor) wurde für jede Platte errechnet. Er gibt die Qualität der verwendeten Kontrollen an indem die Summe der Standardabweichungen aller Kontrollen durch die Mittelwertbereiche der Kontrollen dividiert wird. Liegt der Faktor unter eins, spricht das für sehr hochwertige Kontrollen und damit für einen qualitativ hochwertigen Screen.

$$\text{Z' Faktor} = 1 - 3 \times (\delta p + \delta n) / (\mu p - \mu n)$$

μ = Mittelwert

δ = Standardabweichung

n = Negativkontrolle

p = Positivkontrolle

6.8. Sonstiges

Sonstige Lösungen	
1 x PBS	
KCl	0,2 g
NaCl	8 g
KH_2PO_4	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,16 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1 l

Alle hier aufgeführten Chemikalien, deren Hersteller nicht aufgeführt sind, wurden bei SIG-MA, Roche oder Roth gekauft.

6.9. Verwendete Computer Programme

1. **Scan^R-Programm** (Olympus): Analyse von Aufnahmen des automatischen Fluoreszenz-mikroskops
2. **Photoshop CS3** (Adobe): Bildbearbeitungsprogramm
3. **InDesign CS3** (Adobe): Layoutprogramm
4. **Adobe Illustrator CS3** (Adobe): Graphikprogramm
5. **CorelDRAW 11** (Corel): Graphikprogramm
6. **NCBI BLAST** (NCBI): Vergleich von Sequenz-Homologien im Internet
7. **Microsoft Office Word** (Microsoft): Textbearbeitungsprogramm
8. **Microsoft Office Excel** (Microsoft): Tabellenkalkulationsprogramm
9. **R** (Statistik Programm): statistisches Auswertungsprogramm für naturwissenschaftliche Daten
10. **Sami_{ex}** (Beckman & Coulter): Programm zur Steuerung des Biomek FXP Roboters
11. **LAS AF Lite** (Leica): Bildbearbeitungs-und Bilddarstellungsprogramm für konfokales Leica TCS NT/SPE Mikroskop
12. **BLOCK-iTTM RNAi Designer** (Invitrogen): Erstellung von shRNA Sequenzen
13. **SDS 2.2.2** (Applied Biosystems): Auswertungsprogramm für Real-Time PCR
14. **AIDA Imaging Programm** (raytest): Quantifizierung von Immunoblots
15. **FCS Express V3** (De Novo Software): FACS Analyse Programm

7. Literaturverzeichnis

- Agazie, Y. M. und Hayman, M. J. (2003) Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 23: 7875-7886.
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A. *et al.* (1998) Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 28: 37-53.
- Allen, L. A., Schlesinger, L. S., und Kang, B. (2000) Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp Med* 191: 115-128.
- Alwan, H. A., van Zoelen, E. J., und van Leeuwen, J. E. (2003) Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J Biol Chem* 278: 35781-35790.
- Amieva, M. R. und El Omar, E. M. (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134: 306-323.
- Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J., und Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300: 1430-1434.
- Andrzejewska, J., Lee, S. K., Olbermann, P., Lotzing, N., Katzowitsch, E., Linz, B. *et al.* (2006) Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J Bacteriol* 188: 5865-5877.
- Argent, R. H., Thomas, R. J., Letley, D. P., Rittig, M. G., Hardie, K. R., und Atherton, J. C. (2008) Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J Med Microbiol* 57: 145-150.
- Ashktorab, H., Daremipouran, M., Wilson, M., Siddiqi, S., Lee, E. L., Rakhshani, N. *et al.* (2007) Transactivation of the EGFR by AP-1 is induced by *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 102: 2135-2146.
- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., und Cover, T. L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270: 17771-17777.
- Axon, A. T. (2007) Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion. *Adv Med Sci* 52: 55-60.
- Backert, S. und Meyer, T. F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 9: 207-217.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., und Meyer, T. F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 42: 631-644.
- Backert, S., Schwarz, T., Miehlke, S., Kirsch, C., Sommer, C., Kwok, T. *et al.* (2004) Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* 72: 1043-1056.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P. R. *et al.* (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2: 155-164.
- Bauer, B., Moese, S., Bartfeld, S., Meyer, T. F., und Selbach, M. (2005) Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 73: 4643-4652.
- Beswick, E. J., Pinchuk, I. V., Minch, K., Suarez, G., Sierra, J. C., Yamaoka, Y. *et al.* (2006a) The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect Immun* 74: 1148-1155.
- Beswick, E. J., Suarez, G., und Reyes, V. E. (2006b) *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol* 12: 5599-5605.
- Bizzozero, G. (1983) Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch Mikr Anat* 42: 82-152.

- Blaser, M. J., Chen, Y., und Reibman, J. (2008) Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? Gut 57: 561-567.
- Bodger, K. und Crabtree, J. E. (1998) *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. Br Med Bull 54: 139-150.
- Boughan, P. K., Argent, R. H., Body-Malapel, M., Park, J. H., Ewings, K. E., Bowie, A. G. et al. (2006) Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. J Biol Chem 281: 11637-11648.
- Bourzac, K. M. und Guillemin, K. (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. Cell Microbiol 7: 911-919.
- Bower, J. M., Camble, R., Gregory, H., Gerring, E. L., und Willshire, I. R. (1975) The inhibition of gastric acid secretion by epidermal growth factor. Experientia 31: 825-826.
- Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., Konig, W., und Backert, S. (2005) NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 9300-9305.
- Broome, M. A. und Hunter, T. (1996) Requirement for c-Src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. J Biol Chem 271: 16798-16806.
- Burke, P., Schooler, K., und Wiley, H. S. (2001) Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. Mol Biol Cell 12: 1897-1910.
- Cantorna, M. T. und Balish, E. (1990) Inability of human clinical strains of *Helicobacter pylori* to colonize the alimentary tract of germfree rodents. Can J Microbiol 36: 237-241.
- Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N. B. et al. (1997) CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. Blood 90: 4947-4952.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M. et al. (1996) cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 14648-14653.
- Censini, S., Stein, M., und Covacci, A. (2001) Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. Curr Opin Microbiol 4: 41-46.
- Ceresa, B. P. und Schmid, S. L. (2000) Regulation of signal transduction by endocytosis. Curr Opin Cell Biol 12: 204-210.
- Chen, J., Cohn, J. A., und Mandel, L. J. (1995) Dephosphorylation of ezrin as an early event in renal microvillar breakdown and anoxic injury. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7495-7499.
- Chen, Y. und Blaser, M. J. (2007) Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. Arch Intern Med 167: 821-827.
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P. et al. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11: 263-271.
- Churin, Y., Al Ghouli, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W., und Naumann, M. (2003) *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the mitogenic response. J Cell Biol 161: 249-255.
- Corthesy-Theulaz, I., Porta, N., Pringault, E., Racine, L., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J. P. et al. (1996) Adhesion of *Helicobacter pylori* to polarized T84 human intestinal cell monolayers is pH dependent. Infect Immun 64: 3827-3832.
- Covacci, A. und Rappuoli, R. (2000) Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. J Exp Med 191: 587-592.
- Cover, T. L. und Blaser, M. J. (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 267: 10570-10575.
- Coyle, W. J., Sedlack, R. E., Nemec, R., Peterson, R., Duntemann, T., Murphy, M. et al. (1999) Eradication of *Helicobacter pylori* normalizes elevated mucosal levels of epidermal growth factor and its receptor. Am J Gastroenterol 94: 2885-2889.
- Crabtree, J. E. und Farmery, S. M. (1995) *Helicobacter pylori* and gastric mucosal cytokines: evidence that CagA-positive strains are more virulent. Lab Invest 73: 742-745.

Crabtree, J. E., Kersulyte, D., Li, S. D., Lindley, I. J., und Berg, D. E. (1999) Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. J Clin Pathol 52: 653-657.

Crabtree, J. E., Wyatt, J. I., Trejdosiewicz, L. K., Peichl, P., Nichols, P. H., Ramsay, N. *et al.* (1994) Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. J Clin Pathol 47: 61-66.

Crabtree, J. E., Xiang, Z., Lindley, I. J., Tompkins, D. S., Rappuoli, R., und Covacci, A. (1995) Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol 48: 967-969.

Cunnick, J. M., Meng, S., Ren, Y., Despons, C., Wang, H. G., Djeu, J. Y. *et al.* (2002) Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. J Biol Chem 277: 9498-9504.

D'Elios, M. M., Manghetti, M., De Carli, M., Costa, F., Baldari, C. T., Burroni, D. *et al.* (1997) T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. J Immunol 158: 962-967.

Dallegri, F. und Ottonello, L. (1997) Tissue injury in neutrophilic inflammation. Inflamm Res 46: 382-391.

Deb, T. B., Wong, L., Salomon, D. S., Zhou, G., Dixon, J. E., Gutkind, J. S. *et al.* (1998) A common requirement for the catalytic activity and both SH2 domains of SHP-2 in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation by the ErbB family of receptors. A specific role for SHP-2 in map, but not c-Jun amino-terminal kinase activation. J Biol Chem 273: 16643-16646.

Deininger, M. W., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J. M., und Melo, J. V. (2000) BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. Cancer Res 60: 2049-2055.

Dickson, J. H., Grabowska, A., El Zaatari, M., Atherton, J., und Watson, S. A. (2006) *Helicobacter pylori* can induce heparin-binding epidermal growth factor expression via gastrin and its receptor. Cancer Res 66: 7524-7531.

Dikic, I. und Giordano, S. (2003) Negative receptor signalling. Curr Opin Cell Biol 15: 128-135.

el Shoura, S. M. (1995) *Helicobacter pylori*: I. Ultrastructural sequences of adherence, attachment, and penetration into the gastric mucosa. Ultrastruct Pathol 19: 323-333.

Enarsson, K., Lundgren, A., Kindlund, B., Hermansson, M., Roncador, G., Banham, A. H. *et al.* (2006) Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. Clin Immunol 121: 358-368.

Epplein, M., Nomura, A. M., Hankin, J. H., Blaser, M. J., Perez-Perez, G., Stemmermann, G. N. *et al.* (2008) Association of *Helicobacter pylori* infection and diet on the risk of gastric cancer: a case-control study in Hawaii. Cancer Causes Control.

Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M. *et al.* (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. Science 299: 1582-1585.

Ferrero, R. L., Ave, P., Ndiaye, D., Bambou, J. C., Huerre, M. R., Philpott, D. J. *et al.* (2008) NF-kappaB activation during acute *Helicobacter pylori* infection in mice. Infect Immun 76: 551-561.

Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., und Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. Mol Microbiol 42: 1337-1348.

Flutter, B. und Gao, B. (2004) MHC class I antigen presentation--recently trimmed and well presented. Cell Mol Immunol 1: 22-30.

Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J. C., Contamin, S. *et al.* (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. EMBO J 19: 6361-6370.

Garner, J. A. und Cover, T. L. (1995) Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and non-cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. J Infect Dis 172: 290-293.

Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., und Haas, R. (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. Science 301: 1099-1102.

Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., und Gotz, F. (1998) Characterization of the N-acetylgluco-

saminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 273: 18586-18593.

Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL und Wilson KT. (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 20;98(24):13844-9.

Gobert AP, Cheng Y, Wang JY, Boucher JL, Iyer RK, Cederbaum SD, Casero RA Jr, Newton JC und Wilson KT (2002) *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J Immunol* 1;168(9):4692-700.

Gobert, A. P., Bambou, J. C., Werts, C., Balloy, V., Chignard, M., Moran, A. P. *et al.* (2004) *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem* 279: 245-250.

Grundal, M. V. und Madshus, I. H. (2008) Epidermal Growth Factor Receptor and Cancer: Control of Oncogenic Signalling by Endocytosis. *J Cell Mol Med*.

Gusterson, B., Cowley, G., Smith, J. A., und Ozanne, B. (1984) Cellular localisation of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Int Rep* 8: 649-658.

Hamajima, N., Naito, M., Kondo, T., und Goto, Y. (2006) Genetic factors involved in the development of *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Cancer Sci* 97: 1129-1138.

Hammond, D. E., Urbe, S., Vunde Woude, G. F., und Clague, M. J. (2001) Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 20: 2761-2770.

Hantschel, O. und Superti-Furga, G. (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 33-44.

Hare, S., Fischer, W., Williams, R., Terradot, L., Bayliss, R., Haas, R. *et al.* (2007) Identification, structure and mode of action of a new regulator of the *Helicobacter pylori* HP0525 ATPase. *EMBO J* 26: 4926-4934.

Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 4: 688-694.

Hatakeyama, M. und Brzozowski, T. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11 Suppl 1: 14-20.

Heczko, U., Smith, V. C., Mark, M. R., Buchan, A. M., und Finlay, B. B. (2000) Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes Infect* 2: 1669-1676.

Heinrich, M. C., Griffith, D. J., Druker, B. J., Wait, C. L., Ott, K. A., und Zigler, A. J. (2000) Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 96: 925-932.

Hemalatha, S. G., Drumm, B., und Sherman, P. (1991) Adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelial cells in vitro. *J Med Microbiol* 35: 197-202.

Higashi, H., Nakaya, A., Tsutsumi, R., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ishikawa, S. *et al.* (2004) *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* 279: 17205-17216.

Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. *et al.* (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295: 683-686.

Hirata, Y., Ohmae, T., Shibata, W., Maeda, S., Ogura, K., Yoshida, H. *et al.* (2006) MyD88 and TNF receptor-associated factor 6 are critical signal transducers in *Helicobacter pylori*-infected human epithelial cells. *J Immunol* 176: 3796-3803.

Hirayama, F., Takagi, S., Kusuvara, H., Iwao, E., Yokoyama, Y., und Ikeda, Y. (1996) Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 31: 755-757.

Hong, W., Sano, K., Morimatsu, S., Scott, D. R., Weeks, D. L., Sachs, G. *et al.* (2003) Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 52: 211-216.

Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., und Sorkin, A. (2006) Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* 21: 737-748.

Hubbard, S. R. und Miller, W. T. (2007) Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19: 117-123.

- Jones, N. P. und Katan, M. (2007) Role of phospholipase Cgamma1 in cell spreading requires association with a beta-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* 27: 5790-5805.
- Jones, R. B., Gordus, A., Krall, J. A., und MacBeath, G. (2006) A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* 439: 168-174.
- Kain, K. H. und Klemke, R. L. (2001) Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes. *J Biol Chem* 276: 16185-16192.
- Karnes, W. E., Jr., Samloff, I. M., Siurala, M., Kekki, M., Sipponen, P., Kim, S. W. *et al.* (1991) Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology* 101: 167-174.
- Keates S, Keates AC, Warny M, Peek RM Jr, Murray PG und Kelly CP (1999) Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- *Helicobacter pylori*. *J Immunol* 15;163(10):5552-9
- Keates, S., Keates, A. C., Katchar, K., Peek, R. M., Jr., und Kelly, C. P. (2007) *Helicobacter pylori* induces up-regulation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Infect Dis* 196: 95-103.
- Keates, S., Keates, A. C., Nath, S., Peek, R. M., Jr., und Kelly, C. P. (2005) Transactivation of the epidermal growth factor receptor by cag+ *Helicobacter pylori* induces upregulation of the early growth response gene Egr-1 in gastric epithelial cells. *Gut* 54: 1363-1369.
- Kim, S. Y., Lee, Y. C., Kim, H. K., und Blaser, M. J. (2006) *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cell Microbiol* 8: 97-106.
- Kodama, K., Fujioka, T., Ito, A., Kodama, R., und Nasu, M. (1998) Toxigenicity of *Helicobacter pylori* isolates possessing cagA gene and vacuolating cytotoxin. *J Gastroenterol* 33 Suppl 10: 14-17.
- Koivisto, T. T., Voutilainen, M. E., und Farkkila, M. A. (2008) Effect of smoking on gastric histology in *Helicobacter pylori*-positive gastritis. *Scund J Gastroenterol* 1-7.
- Konturek, S. J. (1990) Role of growth factors in gastroduodenal protection and healing of peptic ulcers. *Gastroenterol Clin North Am* 19: 41-65.
- Konturek, S. J., Cieszkowski, M., Jaworek, J., Konturek, J., Brzozowski, T., und Gregory, H. (1984) Effects of epidermal growth factor on gastrointestinal secretions. *Am J Physiol* 246: G580-G586.
- Kumar, D. und Sinha, A. N. (2002) *Helicobacter pylori* infection delays ulcer healing in patients operated on for perforated duodenal ulcer. *Indian J Gastroenterol* 21: 19-22.
- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S. *et al.* (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449: 862-866.
- Letley, D. P. und Atherton, J. C. (2000) Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol* 182: 3278-3280.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I. *et al.* (1999) Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4: 1029-1040.
- Li, H., Mellgard, B., und Helander, H. F. (1997) Inoculation of VacA- and CagA- *Helicobacter pylori* delays gastric ulcer healing in the rat. *Scund J Gastroenterol* 32: 439-444.
- Lundgren, A., Stromberg, E., Sjoling, A., Lindholm, C., Enarsson, K., Edebo, A. *et al.* (2005) Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect Immun* 73: 523-531.
- Machuy, N., Campa, F., Thieck, O., und Rudel, T. (2007) c-Abl-binding protein interacts with p21-activated kinase 2 (PAK-2) to regulate PDGF-induced membrane ruffles. *J Mol Biol* 370: 620-632.
- Maeda, S., Akanuma, M., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ogura, K., Yoshida, H. *et al.* (2001) Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem* 276: 44856-44864.
- Mundell, L., Moran, A. P., Cocchiarella, A., Houghton, J., Taylor, N., Fox, J. G. *et al.* (2004) Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun* 72: 6446-6454.
- Marmor, M. D. und Yarden, Y. (2004) Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor ty-

rosine kinases. *Oncogene* 23: 2057-2070.

Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. B., und Glancy, R. J. (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 142: 436-439.

Marshall, B. J. und Warren, J. R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.

Medina, D. L., Sciarretta, C., Calella, A. M., Bohlen Und, H. O., Unsicker, K., und Minichiello, L. (2004) TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLCgamma-mediated control of neuronal migration. *EMBO J* 23: 3803-3814.

Mimuro, H., Suzuki, T., Tanaka, J., Asahi, M., Haas, R., und Sasakawa, C. (2002) Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* 10: 745-755.

Mitsushima, M., Takahashi, H., Shishido, T., Ueda, K., und Kioka, N. (2006) Abl kinase interacts with and phosphorylates vinexin. *FEBS Lett* 580: 4288-4295.

Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., Karlas, A., Haimovich, B., Backert, S. *et al.* (2007) The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cell Microbiol* 9: 1148-1161.

Moese, S., Selbach, M., Meyer, T. F., und Backert, S. (2002) *cag+* *Helicobacter pylori* induces homotypic aggregation of macrophage-like cells by up-regulation and recruitment of intracellular adhesion molecule 1 to the cell surface. *Infect Immun* 70: 4687-4691.

Moese, S., Selbach, M., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., und Backert, S. (2001) Identification of a tyrosine-phosphorylated 35 kDa carboxy-terminal fragment (p35CagA) of the *Helicobacter pylori* CagA protein in phagocytic cells: processing or breakage? *Proteomics* 1: 618-629.

Montecucco, C. und Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 457-466.

Morris, A. und Nicholson, G. (1987) Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 82: 192-199.

Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W. *et al.* (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55: 5536-5539.

Nagai, H. und Roy, C. R. (2003) Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell Microbiol* 5: 373-383.

Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoe, K., Yamazaki, S. *et al.* (2006) Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 130: 1181-1190.

Naito, Y., Kino, I., Horiuchi, K., und Fujimoto, D. (1984) Promotion of collagen production by human fibroblasts with gastric cancer cells in vitro. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 46: 145-154.

Namiot, A., Kemon, A., und Namiot, Z. (2007) Smoking habit and gastritis histology. *Adv Med Sci* 52: 191-195.

Neel, B. G., Gu, H., und Pao, L. (2003) The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 28: 284-293.

Neel, B. G. und Tonks, N. K. (1997) Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9: 193-204.

Neumann, M., Foryst-Ludwig, A., Klar, S., Schweitzer, K., und Naumann, M. (2006) The PAK1 autoregulatory domain is required for interaction with NIK in *Helicobacter pylori*-induced NF-kappaB activation. *Biol Chem* 387: 79-86.

Nguyen, T. N., Barkun, A. N., und Fallone, C. A. (1999) Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter* 4: 185-197.

Noach, L. A., Rolf, T. M., und Tytgat, G. N. (1994) Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* 47: 699-704.

Nurmio, M., Kallio, J., Toppari, J., und Jahnukainen, K. (2008) Adult reproductive functions after early post-natal inhibition by imatinib of the two receptor tyrosine kinases, c-kit and PDGFR, in the rat testis. *Reprod Toxicol* 25: 442-446.

- Odenbreit, S., Gebert, B., Puls, J., Fischer, W., und Haas, R. (2001) Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol* 3: 21-31.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerlund, E., Fischer, W., und Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287: 1497-1500.
- Oksvold, M. P., Skarpen, E., Wierod, L., Paulsen, R. E., und Huitfeldt, H. S. (2001) Re-localization of activated EGF receptor and its signal transducers to multivesicular compartments downstream of early endosomes in response to EGF. *Eur J Cell Biol* 80: 285-294.
- Oliveira, M. J., Costa, A. C., Costa, A. M., Henriques, L., Suriano, G., Atherton, J. C. *et al.* (2006) *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. *J Biol Chem* 281: 34888-34896.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A und Mann M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1(5):376-86.
- Pai, R., Wyle, F. A., Cover, T. L., Itani, R. M., Domek, M. J., und Tarnawski, A. S. (1998) *Helicobacter pylori* culture supernatant interferes with epidermal growth factor-activated signal transduction in human gastric KATO III cells. *Am J Pathol* 152: 1617-1624.
- Panchal, P. C., Forman, J. S., Blumberg, D. R., und Wilson, K. T. (2003) *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 19: 4-10.
- Pattis, I., Weiss, E., Laugks, R., Haas, R., und Fischer, W. (2007) The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology* 153: 2896-2909.
- Peek, R. M., Jr. und Blaser, M. J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2: 28-37.
- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K. E. *et al.* (1996) Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* 273: 1231-1233.
- Philpott, D. J., Belaid, D., Troubadour, P., Thiberge, J. M., Tankovic, J., Labigne, A. *et al.* (2002) Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol* 4: 285-296.
- Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K. A., Kazlauskas, A., und Pendergast, A. M. (1999) c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 13: 2400-2411.
- Polo, S., Pece, S., und Di Fiore, P. P. (2004) Endocytosis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 16: 156-161.
- Poppe, M., Feller, S. M., Romer, G., und Wessler, S. (2007) Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26: 3462-3472.
- Pyndiah, S., Lasserre, J. P., Menard, A., Claverol, S., Prouzet-Mauleon, V., Megraud, F. *et al.* (2007) Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multiprotein complexes from *Helicobacter pylori*. *Mol Cell Proteomics* 6: 193-206.
- Rieder, G., Fischer, W., und Haas, R. (2005) Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr Opin Microbiol* 8: 67-73.
- Roepstorff, K., Grovdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., und van Deurs, B. (2008) Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol* 129: 563-578.
- Rohde, M., Puls, J., Buhrdorf, R., Fischer, W., und Haas, R. (2003) A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol* 49: 219-234.
- Rosenberg, N. und Witte, O. N. (1988) The viral and cellular forms of the Abelson (abl) oncogene. *Adv Virus Res* 35: 39-81.
- Rushlow, C. und Warrior, R. (1992) The rel family of proteins. *Bioessays* 14: 89-95.
- Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y. *et al.* (2007) *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447: 330-333.
- Saha, A., Hammond, C. E., Trojanowska, M., und Smolka, A. J. (2008) *Helicobacter pylori*-induced H,K-ATPase alpha-subunit gene repression is mediated by NF-kappaB p50 homodimer promoter binding. *Am J Physiol*

Gastrointest Liver Physiol 294: G795-G807.

Salama, N. R., Shepherd, B., und Falkow, S. (2004) Global Transposon Mutagenesis and Essential Gene Analysis of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 186: 7926-7935.

Salama NR, Gonzalez-Valencia G, Deatherage B, Aviles-Jimenez F, Atherton JC, Graham DY, und Torres J. (2007) Genetic analysis of *Helicobacter pylori* strain populations colonizing the stomach at different times postinfection. J Bacteriol 189(10):3834-45.

Savvides, S. N., Yeo, H. J., Beck, M. R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E. *et al.* (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. EMBO J 22: 1969-1980.

Sawamura, D., Goto, M., Shibaki, A., Akiyama, M., McMillan, J. R., Abiko, Y. *et al.* (2005) Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. Gene Ther 12: 857-861.

Schiemann, U., Konturek, J., Assert, R., Rembiaz, K., Domschke, W., Konturek, S. *et al.* (2002) mRNA expression of EGF receptor ligands in atrophic gastritis before and after *Helicobacter pylori* eradication. Med Sci Monit 8: CR53-CR58.

Schmitt, W. und Haas, R. (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. Mol Microbiol 12: 307-319.

Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O. *et al.* (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 5024-5029.

Schwartz, J. T. und Allen, L. A. (2006) Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. J Leukoc Biol 79: 1214-1225.

Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., und Tompkins, L. S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 14559-14564.

Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P. R., und Meyer, T. F. (2004) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. Proteomics 4: 2961-2968.

Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F., und Backert, S. (2002a) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. J Biol Chem 277: 6775-6778.

Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C. R., Meyer, T. F., und Backert, S. (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. EMBO J 22: 515-528.

Selbach, M., Moese, S., Meyer, T. F., und Backert, S. (2002b) Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. Infect Immun 70: 665-671.

Seto, K., Hayashi-Kuwabara, Y., Yoneta, T., Suda, H., und Tamaki, H. (1998) Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. FEBS Lett 431: 347-350.

Shaw, G. P., Hatt, J. F., Anderson, N. G., und Hanson, P. J. (1987) Action of epidermal growth factor on acid secretion by rat isolated parietal cells. Biochem J 244: 699-704.

Shimoyama, T. und Crabtree, J. E. (1997) Mucosal chemokines in *Helicobacter pylori* infection. J Physiol Pharmacol 48: 315-323.

Shin, S. und Roy, C. R. (2008) Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol 10: 1209-1220.

Smith, J. M. und Mayer, B. J. (2002) Abl: mechanisms of regulation and activation. Front Biosci 7: d31-d42.

Snelling, W. J., Moran, A. P., Ryan, K. A., Scully, P., McGourty, K., Cooney, J. C. *et al.* (2007) HorB (HP0127) is a gastric epithelial cell adhesin. Helicobacter 12: 200-209.

Sorkin, A. und Goh, L. K. (2008) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. Exp Cell Res.

Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W. J., und Covacci, A. (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. Mol Microbiol 43: 971-980.

Stein, M., Rappuoli, R., und Covacci, A. (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 1263-1268.

Stingl, K., Altendorf, K., und Bakker, E. P. (2002) Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity

trigger cytoplasmic pH homeostasis? Trends Microbiol 10: 70-74.

Tabel, G., Hoa, N. T., Tarnawski, A., Chen, J., Domek, M., und Ma, T. Y. (2003) *Helicobacter pylori* infection inhibits healing of the wounded duodenal epithelium in vitro. J Lab Clin Med 142: 421-430.

Takenaka, R., Yokota, K., Ayada, K., Mizuno, M., Zhao, Y., Fujinami, Y. *et al.* (2004) *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. Microbiology 150: 3913-3922.

Tammer, I., Brandt, S., Hartig, R., König, W., und Backert, S. (2007) Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. Gastroenterology 132: 1309-1319.

Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., und Sasakawa, C. (2003) Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. Cell Microbiol 5: 395-404.

Tang, Z., Zhao, M., Ji, J., Yang, G., Hu, F., He, J. *et al.* (2004) Overexpression of gastrin and c-met protein involved in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. Oncol Rep 11: 333-339.

Tanos, B. und Pendergast, A. M. (2006) Abl tyrosine kinase regulates endocytosis of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 281: 32714-32723.

Tarnawski, A. S. und Jones, M. K. (1998) The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. J Clin Gastroenterol 27 Suppl 1: S12-S20.

Tartaglia, M., Mehler, E. L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H. G., Kremer, H. *et al.* (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet 29: 465-468.

Telford, J. L., Covacci, A., Rappuoli, R., und Chiara, P. (1997) Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. Curr Opin Immunol 9: 498-503.

Thomas, S. M. und Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu Rev Cell Dev Biol 13: 513-609.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 388: 539-547.

Tombola, F., Carlesso, C., Szabo, I., de Bernard, M., Reyat, J. M., Telford, J. L. *et al.* (1999) *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. Biophys J 76: 1401-1409.

Tomczak, M. F., Erdman, S. E., Davidson, A., Wang, Y. Y., Nambiar, P. R., Rogers, A. B. *et al.* (2006) Inhibition of *Helicobacter hepaticus*-induced colitis by IL-10 requires the p50/p105 subunit of NF-kappa B. J Immunol 177: 7332-7339.

Torres, V. J., VanCompernelle, S. E., Sundrud, M. S., Unutmaz, D., und Cover, T. L. (2007) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets. J Immunol 179: 5433-5440.

Treiber, G. und Lambert, J. R. (1998) The impact of *Helicobacter pylori* eradication on peptic ulcer healing. Am J Gastroenterol 93: 1080-1084.

Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M., und Hatakeyama, M. (2003) Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. J Biol Chem 278: 3664-3670.

Tsutsumi, R., Takahashi, A., Azuma, T., Higashi, H., und Hatakeyama, M. (2006) Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. Mol Cell Biol 26: 261-276.

Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61: 203-212.

Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den, E. S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A. *et al.* (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature 252: 169-170.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P. *et al.* (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. Nat Immunol 5: 1166-1174.

Wallasch, C., Crabtree, J. E., Bevec, D., Robinson, P. A., Wagner, H., und Ullrich, A. (2002) *Helicobacter pylori*-stimulated EGF receptor transactivation requires metalloprotease cleavage of HB-EGF. Biochem Biophys Res

Commun 295: 695-701.

Wang, F., Xia, P., Wu, F., Wang, D., Wang, W., Ward, T. *et al.* (2008) *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. J Biol Chem.

Waterman, H., Katz, M., Rubin, C., Shtiegman, K., Lavi, S., Elson, A. *et al.* (2002) A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. EMBO J 21: 303-313.

Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., und Yarden, Y. (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 274: 22151-22154.

Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R., und Sachs, G. (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science 287: 482-485.

Wessler, S., Hocker, M., Fischer, W., Wang, T. C., Rosewicz, S., Haas, R. *et al.* (2000) *Helicobacter pylori* activates the histidine decarboxylase promoter through a mitogen-activated protein kinase pathway independent of pathogenicity island-encoded virulence factors. J Biol Chem 275: 3629-3636.

Weydig, C., Starzinski-Powitz, A., Carra, G., Lower, J., und Wessler, S. (2007) CagA-independent disruption of adherence junction complexes involves E-cadherin shedding and implies multiple steps in *Helicobacter pylori* pathogenicity. Exp Cell Res 313: 3459-3471.

WHO (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 61: 1-241.

Wiznerowicz, M. und Trono, D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. J Virol 77: 8957-8961.

Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S. *et al.* (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 2965-2969.

Wong, B. C., Wang, W. P., So, W. H., Shin, V. Y., Wong, W. M., Fung, F. M. *et al.* (2001) Epidermal growth factor and its receptor in chronic active gastritis and gastroduodenal ulcer before and after *Helicobacter pylori* eradication. Aliment Pharmacol Ther 15: 1459-1465.

Wu, C. W., Li, A. F., Chi, C. W., Chung, W. W., Liu, T. Y., Lui, W. Y. *et al.* (1998) Hepatocyte growth factor and Met/HGF receptors in patients with gastric adenocarcinoma. Oncol Rep 5: 817-822.

Wunder, C., Churin, Y., Winau, F., Warnecke, D., Vieth, M., Lindner, B. *et al.* (2006) Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. Nat Med 12: 1030-1038.

Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R. *et al.* (1995) Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect Immun 63: 94-98.

Xu, K. P. und Yu, F. S. (2007) Cross talk between c-Met and epidermal growth factor receptor during retinal pigment epithelial wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 2242-2248.

Yamaguchi, H., Osaki, T., Kurihara, N., Kitajima, M., Kai, M., Takahashi, M. *et al.* (1999) Induction of secretion of interleukin-8 from human gastric epithelial cells by heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 48: 927-933.

Yamaoka, Y., Kudo, T., Lu, H., Casola, A., Brasier, A. R., und Graham, D. Y. (2004) Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology 126: 1030-1043.

Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. Eur J Cancer 37 Suppl 4: S3-S8.

Yarden, Y. und Schlessinger, J. (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. Biochemistry 26: 1443-1451.

Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 127-137.

Yokota, K., Kurebayashi, Y., Takayama, Y., Hayashi, S., Isogai, H., Isogai, E. *et al.* (1991) Colonization of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. Microbiol Immunol 35: 475-480.

Yokota, S., Ohnishi, T., Muroi, M., Tanamoto, K., Fujii, N., und Amano, K. (2007) Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not

Toll-like receptor 4 complex. FEMS Immunol Med Microbiol 51: 140-148.

Zhao, Y., Yokota, K., Ayada, K., Yamamoto, Y., Okada, T., Shen, L. *et al.* (2007) *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. J Med Microbiol 56: 154-164.

Zhu, G., Decker, S. J., Mayer, B. J., und Saltiel, A. R. (1993) Direct analysis of the binding of the abl Src homology 2 domain to the activated epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 268: 1775-1779.

Zijlstra, J. G., de Vries, E. G., und Mulder, N. H. (1987) Multifactorial drug resistance in an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line. Cancer Res 47: 1780-1784.

Zupan, J. R. und Zambryski, P. (1995) Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. Plant Physiol 107: 1041-1047.

8. Publikationsliste

Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., Droege, A., Lindenberg, KS., Knoblich, M., Haenig, C., Herbst, M., Suopanki, J., Scherzinger, E., Abraham, C., Bauer, B., Hasenbank, R., Fritzsche, A., Ludewig, AH., Büssow, K., Coleman, SH., Gutekunst, CA., Landwehrmeyer, BG., Lehrach, H., und Wanker, EE. (2005) A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington`s disease. *Mol. Cell.*, 24; 15(6):853-65

Bauer, B., Stefan, M., Bartfeld, S., Meyer, S., und Selbach, M. (2005) Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretions system of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 73(8):4643-52

Bauer, B., Bartfeld, S. und Meyer, TF. (2008) *H. pylori* selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA. *Cell. Micorbiol.*, (22 Okt 2008; elektronische Druckausgabe (Epub) einsehbar)

Bauer, B., Bartfeld, S., Holland, C., Maeurer, A. und Meyer, TF. (2008) Prolonged infections with *Helicobacter pylori* impair epithelial wound healing by interfering EGFR signaling., (in Vorbereitung)

Bauer, B., Asakura, H., Machuy, N., Bartfeld, S. und Meyer, TF. (2008) A genome-wide screen for NF- κ B effectors, T4SS components and bacterial adhesins of *Helicobacter pylori*., (in Vorbereitung)

Bartfeld, S., Engels, C., Bauer, B., Aurass, P., Flieger, A., Brueggemann, H., Meyer, TF. (2008) Two tracked NF- κ B activation by *Legionella pneumophila*., (in Vorbereitung)

Bartfeld, S., Bauer, B., Hess, S., Meyer, TF. (2008) Imaging NF- κ B oscillations: Monoclonal cell lines show stimulus specificity and temporal control. (in Vorbereitung)

9. Kongressbeiträge

Studententag der Lebenswissenschaften in Berlin Mitte; 2005

Bauer, B., Stefan, M., Bartfeld, S., Meyer, S., und Selbach, M. (2005) Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretions system of *Helicobacter pylori*. (**Vortrag**)

2. Gemeinsamer Kongress der GHM und VAAM in Göttingen; 2005

Bauer, B., Stefan, M., Bartfeld, S., Meyer, S., und Selbach, M. (2005) Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretions system of *Helicobacter pylori*. (**Vortrag**)

INCA Consortium Meeting in Lissabon; 2007

Bauer, B., Bartfeld, S., Machuy, N., und Meyer, TF (2007) Genome wide Screening for NF- κ B effector proteins, T4SS related proteins and bacterial adhesins of *Helicobacter pylori*. (**Vortrag**)

Cold Spring Harbor Laboratory Microbial Pathogenesis and Host Response meeting in New York; 2007

Bauer, B., Bartfeld, S., und Meyer, TF (2007) *Helicobacter pylori* impairs EGFR signaling by blocking EGFR endocytosis via c-Abl in a CagA dependent manner. (**Poster**)

6. *Helicobacter pylori*-Workshop in Herrsching; 2007

Bauer, B., Bartfeld, S., und Meyer, TF (2007) *Helicobacter pylori* blocks EGFR signalling by inhibiting receptor endocytosis via c-Abl in a CagA dependent manner. (**Vortrag**)

8th International workshop in Pathogenesis and Host response in *Helicobacter* infections in Helsingoer; 2008

Bauer, B., Bartfeld, S. und Meyer, TF (2008) *H. pylori* selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA. (**Vortrag**)

Workshop Bacterial Type IV Secretion Systems in human Disease in Baeza; 2008

Bauer, B., Asakura, N., Machuy, N., Bartfeld, S., Salama, N. und Meyer, TF (2008) Genome wide screening for *Helicobacter pylori* NF- κ B effector proteins, T4SS related proteins and bacterial adhesins (**Poster**)

10. Danksagung

Nun fängt fast der schwerste Teil der schriftlichen Arbeit an. Wie dankt man all den Leuten, die einen auf dem langen, mühseligen, aufregenden, frustrierenden, erheiternden und auch sehr spannenden Weg begleitet haben? Viele von ihnen haben mich unterstützt, einige haben mir die Arbeit erst möglich gemacht. Findet man die richtigen Worte und-noch viel schlimmer-vergisst man vielleicht aus Versehen jemanden? Deshalb ist diese Danksagung auch etwas länger geworden als üblich. Ich bitte dies zu entschuldigen.

An erster Stelle möchte ich mich natürlich bei Herrn Prof. Meyer bedanken. Er hat mir die Arbeit an dem großartigen Institut ermöglicht und mir während meiner Arbeit jegliche wissenschaftliche Freiheit gewährt, um kreativ zu sein und neue Projektideen entwickeln zu können. In unzähligen Diskussionen kam es zu zahlreichen, hilfreichen Vorschlägen, die mir oft einen Denkanstoß gegeben haben. Vielen Dank für alles!

Auch Herrn Prof. Schneider möchte ich ganz besonders für die Betreuungsarbeit danken, die es mir ermöglicht hat, meine Dr-Arbeit an der Humboldt-Universität zu Berlin anzumelden und einzureichen. Dies ist besonders deshalb so dankenswert, da ich als externe Doktorandin darauf angewiesen war, einen Betreuer an der Universität meines Wunsches zu finden. Vielen Dank dafür! Aus diesem Grund geht ebenfalls ein besonderer Dank an Herrn Prof. Sommer, der sich die Zeit genommen hat, sich mit meiner Arbeit auseinanderzusetzen.

Denke ich an meine anfängliche Doktorandenzeit zurück, in der man noch „grün hinter den Ohren“ war und noch sehr auf eine interne Betreuung angewiesen war, so fallen mir gleich zwei Personen ein, die zu diesem Zeitpunkt sehr wichtig waren: Herr Dr. Stefan Moese und Herr Dr. Matthias Selbach, zwei „Corniferen“ auf ihrem Gebiet und wunderbare Betreuer. Sie haben mich in die *Helicobacter*-Welt eingeführt, erste Projekte ausgedacht, mir alle Fragen geduldig beantwortet und mir sehr beim Schreiben der ersten Publikation geholfen.

Unserem ehemaligen TA Christian Sommer möchte ich herzlich für die vielen aufheiternden Momente danken, die mich immer wieder aus dem Loch der Verzweiflung geholt haben, wenn es mal nicht so lief. Die schönen Lieder wie „Bolle reiste jüngst nach Pfingsten“ haben wir zu zweit und sogar als Kanon gesungen. Vielen Dank dafür!

Dem lieben Jörg Angermann möchte ich für seine aufopfernde Hilfsbereitschaft danken. Er hat mich in dem letzten Jahr meiner Arbeit mit Leibeskräften als TA unterstützt. Er hält das gesamte Labor in Schuss. Danke lieber Jörg!

Natürlich darf ich meine Mädels hier nicht vergessen: Dr. Andrea Wehrens, Dr. Dagmar Heuer und (noch nicht, aber bald Dr.) Anette Rejman-Lipinski. Es ist schön auf der Arbeit auch Freunde zu finden, die einem nicht nur wissenschaftlich unter die Arme greifen, sondern auch immer ein offenes Ohr haben, wenn es einem mal schlecht geht. Vielen lieben Dank an Euch drei!

Mein Dank geht natürlich auch an Sina Bartfeld (auch bald Dr.). Gemeinsam haben wie fast

die gesamte Zeit meiner Dr-Arbeit darum gekämpft, wichtige Fragen zu *Helicobacter pylori* zu klären und dabei viele Stunden zusammen im Labor verbracht. Da wächst man zusammen. Vielen Dank für die konstruktiven Vorschläge und die Korrektur-Arbeiten an der letzten Publikation.

I would like to also thank Dr. Hiroshi Asakura for his amazing help and support during the final steps of the screening project. He had not only one important "break through" idea, which made the screen feasible at all. Thank you very much Hiroshi!

Wenn ich nun an den *Screen* denke, dann fallen mir noch zwei weitere Namen ein. Ich möchte unserem *Screening*-Koordinator Dr. Nik Machuy danken. Auch er hat mich mit vielen guten Tipps versorgt. Durch seinen unermüdlichen und sehr professionellen Einsatz sind *Screening*-Projekte in dem Umfang erst möglich geworden. Ganz, ganz großer Dank geht auch an David Manntz, der Vater der Roboter. Er hat die automatischen Infektionen mit „Miss Money-Penny“ zum Laufen gebracht und war immer da, wenn ich ihn während der langen *Screening*-Phase gebraucht habe.

Ich möchte auch unseren beiden Angelas danken. Sie unterstützen uns mit ihrer Arbeit bei allem was wir im Labor machen. Durch ihren Fleiß beim *Helicobacter*-Platten gießen oder Puffer herstellen nehmen sie uns viel Arbeit ab und lassen uns mehr Zeitraum für unsere Forscher-Fantasien. Auch Dagmar Frahm, unsere Zellkulturfee, hat ein dickes Dankeschön verdient. Elke Ziska, der Klonierungsfee, danke ich ebenfalls sehr.

Dr. André Mauerer möchte ich herzlich für seine Einführung in die Auswertung von RT-PCRs danken. Das war wirklich harte Arbeit und ist viel komplizierter als man am Anfang vermutet.

Herrn Dr. Volker Brinkmann steht auch ein dickes Dankeschön zu. Durch seine geduldigen Erklärungsversuche hat er mir die Welt der Mikroskopie näher gebracht. Volker, wo läuft nochmal der Strahlengang beim SPE entlang?

An Herrn Robert Hurwitz geht auch ein liebes Dankeschön. Die Bemühungen T4SS spezifische Antikörper zu generieren war leider erfolglos, und es hat einiges an Zeit gekostet.

Vielen lieben Dank an das gesamte Labor 247. Vor allem Herrn Dr. Juri Churin möchte ich für seine großartige Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragestellungen danken. Keiner hatte mehr hilfreiche Ideen als er wenn es um praktische Fragen ging.

Ralf Träger, Susanne Pfaffenbrot und Oliver Friedrichs möchte ich für ihre große Hilfe bei allen Problemen im IT-Bereich danken.

Frau Dr. Lesley Ogilvie und Frau Dr. Phoebe Harjes möchte ich hier sehr für Ihre konstruktiven Korrekturen an meinem letzten Manuskript danken.

Nicht zu vergessen, Herr Dr. Daniel Becker. Er hat mit großer Geduld meine Arbeit korrigiert und all sein Wissen um deutsche Grammatik und Rechtschreibung mit einfließen lassen. Mit seinem wissenschaftlichen Scharfsinn hat er tatsächlich jeden Satz überprüft. Vielen, vielen Dank lieber Daniel für die große Mühe, die Du auf Dich genommen hast.

Meinem geliebten Lebenspartner Björn Schwanhäusser gebührt mein herzlichster Dank.

Seine Geduld und Liebe, aber auch seine fachliche Kompetenz und Kritik hat mich sehr inspiriert und mir in schweren Stunden dabei geholfen weiter zu machen. Manchmal muss man ganz weit weg fahren um sich ganz, ganz nahe zu kommen Es ist wunderbar, dass Du an meiner Seite bist. Danke!

Ganz zum Schluss aber in meinem Herzen ganz vorn dabei, möchte ich meiner lieben Familie danken: Mama, Papa, Karin, Verena, Inge, Hans-Joachim und dem liebe Opa! Vielen Dank, dass ihr mich immer unterstützt und immer an mich geglaubt habt. Es ist schön eine so tolle Familie zu haben! Man kann sich auf Euch verlassen wann immer ich Euch brauche. Ich küsse Euch!